

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Jana Novak

808/N



**UTJECAJ ULTRAZVUKA  
VISOKOG INTENZITETA NA  
MASNE KISELINE I VLAKNA  
BUČINE POGAČE, PROSA I  
HELJDE**



Rad je izrađen u Laboratoriju za kemiju i tehnologiju žitarica na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Nikoline Čukelj te uz pomoć asistentice Bojane Voučko, dipl. ing. i tehničke suradnice Lidije Drobac, univ. bacc. ing.



Diplomski rad je izrađen u okviru znanstveno-istraživačkog projekta Od nusproizvoda u preradi žitarica i uljarica do funkcionalne hrane primjenom inovativnih procesa (IP-2016-06-3789) financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.





*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Nikolini Čukelj na pomoći, susretljivosti, uloženom trudu i vremenu te ukazanom povjerenju pri izradi ovog rada. Također se zahvaljujem Bojani Voučko, dipl. ing. i Lidiji Drobac, univ. bacc. ing. na pomoći i pristupačnosti prilikom eksperimentalne izvedbe.*

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci, razumijevanju i strpljivosti.*



## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju žitarica

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Nutricionizam

### UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKOG INTENZITETA NA MASNE KISELINE I VLAKNA BUČINE POGAČE, PROSA I HELJDE

*Jana Novak, 808/N*

**Sažetak:** U ovom radu ispitan je utjecaj tretmana ultrazvukom visokog intenziteta na udio nezasićenih masnih kiselina te topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana bučine pogače, prosa i heljde. Tretman je proveden izravnim uranjanjem ultrazvučne sonde (promjera 22 mm, 400 W, 24 kHz) u uzorak pri 100 % amplitude u trajanju od 5, 10 i 20 min. Tretirani uzorak odmašćen je metodom po Soxhletu te je ulje korišteno za određivanje udjela nezasićenih masnih kiselina, a odmašćeni kruti uzorak za analizu vlakana. Rezultati pokazuju da ultrazvuk visokog intenziteta uglavnom nema utjecaj na udio i sastav nezasićenih masnih kiselina, među kojima je u svim uzorcima dominirala polinezasićena omega-6 linolna masna kiselina. Statistički značajna razlika uočena je samo u udjelu netopljivih vlakana heljde čiji se udio povećao sa 4,10 % na 6,66 %, dok promjene na topljivim vlakanima nisu zabilježene. Dodatno, među ispitivanim uzorcima, kao potencijalnim sirovinama za izradu funkcionalne hrane, bučina pogača pokazala se kao najbogatiji izvor proteina, prehrambenih vlakana, masnih kiselina i pepela.

**Ključne riječi:** ultrazvuk visokog intenziteta, nezasićene masne kiseline, prehrambena vlakna, bučina pogača, proso, heljda

**Rad sadrži:** 60 stranica, 14 slika, 9 tablica, 90 literaturnih navoda, 3 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Nikolina Čukelj

**Pomoć pri izradi:** Bojana Voučko, dipl. ing. i Lidija Drobac, univ. bacc. ing.

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Duška Ćurić
2. Doc. dr. sc. Nikolina Čukelj
3. Izv. prof. dr. sc. Sandra Balbino
4. Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak (zamjena)

**Datum obrane:** 29. rujna 2017.



## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Cereal Chemistry and Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Nutrition

### INFLUENCE OF HIGH INTENSITY ULTRASOUND TREATMENT ON FATTY ACIDS AND FIBER OF PUMPKIN SEED CAKE, MILLET AND BUCKWHEAT

*Jana Novak, 808/N*

**Abstract:** This study explored the effect of high intensity ultrasound treatment on pumpkin seed cake, millet and buckwheat flour, on their unsaturated fatty acids composition, as well as insoluble and soluble dietary fibre content. The treatment was preformed by direct immersion of an ultrasonic probe (400 W) into the sample, at 100 % amplitude, during 5, 10 and 20 minutes. The treated sample was defatted using Soxhlet method and the extracted oil was used to determine the content of unsaturated fatty acids, while the defatted solid sample was used for dietary fiber analysis. Results show that high intensity ultrasound in general doesn't have any effect on unsaturated fatty acid content, among which polyunsaturated omega-6 linoleic acid dominated. Statistically significant difference was observed only in the content of insoluble dietary fibre in buckwheat which increased from 4,10 % to 6,66 %, while changes in soluble dietary fiber were not recorded. Additionally, among the investigated material suitable for functional food production, pumpkin seed cake has proven to be the richest source of protein, dietary fiber, fatty acids and ashes.

**Keywords:** high intensity ultrasound, unsaturated fatty acids, dietary fiber, pumpkin seed cake, millet, buckwheat

**Thesis contains:** 60 pages, 14 figures, 9 tables, 90 references, 3 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *PhD Nikolina Čukelj, Assistant Professor*

**Technical support and assistance:** *Bojana Voučko, BSc i Lidija Drobac, univ. bacc. ing.*

#### Reviewers:

1. PhD Duška Ćurić, Full Professor
2. PhD Nikolina Čukelj, Assistant Professor
3. PhD Sandra Balbino, Associate Professor
4. PhD Anet Režek Jambrak, Associate Professor (substitute)

**Thesis defended:** 29 September 2017



## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>3</b>
2.1 ULTRAZVUK U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI.....	3
2.1.1. Podjela i primjena.....	3
2.1.2. Mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta.....	4
2.1.3. Učinci ultrazvuka visokog intenziteta .....	5
2.2. PREHRAMBENA VLAKNA .....	7
2.2.1. Definicija, podjela i prehrambeni izvori.....	7
2.2.2. Utjecaj na zdravlje.....	9
2.3. NEZASIĆENE MASNE KISELINE .....	11
2.3.1. Podjela i prehrambeni izvori .....	11
2.3.2. Utjecaj na zdravlje.....	12
2.4. SASTOJCI ZA PROIZVODNJU FUNKCIONALNIH PROIZVODA .....	15
2.4.1. Bučina pogača .....	15
2.4.1.1. Kemijski sastav.....	15
2.4.1.2. Primjena u proizvodnji prehrambenih proizvoda .....	15
2.4.2. Proso.....	16
2.4.2.1. Kemijski sastav.....	16
2.4.2.2. Primjena u proizvodnji prehrambenih proizvoda .....	16
2.4.3. Heljda .....	17
2.4.3.1. Kemijski sastav.....	17
2.4.3.2. Primjena u proizvodnji prehrambenih proizvoda .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIJAL.....	18
3.2. METODE RADA .....	18
3.2.1. Kemijski sastav heljde, prosa i bučine pogače .....	18
3.2.1.1. Određivanje količine vode.....	18
3.2.1.2. Određivanje sadržaja dušika (proteina) po Kjeldahl-u .....	19
3.2.1.3. Ekstrakcija masti po Soxhletu .....	22
3.2.1.4. Određivanje udjela netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana .....	22
3.2.1.5. Određivanje sadržaja šećera volumetrijski po Luff-Schoorl-u.....	27
3.2.1.6. Određivanje količine pepela .....	31
3.2.1.7. Određivanje sadržaja raspoloživih ugljikohidrata .....	32
3.2.2. Određivanje utjecaja tretmana ultrazvukom na sastav nezasićenih masnih kiselina heljde, prosa i bučine pogače .....	32





3.2.2.1. Priprema uzoraka.....	32
3.2.2.2. Priprema metilnih estera masnih kiselina.....	33
3.2.2.3. Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom .....	34
3.2.3. Određivanje utjecaja tretmana ultrazvukom na udio netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana.....	35
3.2.4. Obrada rezultata.....	35
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>36</b>
4.1. KEMIJSKI SASTAV HELJDE, PROSA i BUČINE POGAČE .....	37
4.2. UTJECAJ TRETMANA ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA NA UDIO NEZASIĆENIH MASNIH KISELINA HELJDE, PROSA i BUČINE POGAČE .....	40
4.3. UTJECAJ TRETMANA ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA NA UDIO NETOPLJIVIH I TOPLJIVIH PREHRAMBENIH VLAKANA HELJDE, PROSA i BUČINE POGAČE .....	45
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>49</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>50</b>
<b>7. PRILOZI .....</b>	<b>58</b>
7.1. EKSPERIMENTALNI DIO .....	58



# 1. UVOD

Posljednjih godina javlja se povećano zanimanje potrošača za funkcionalnim proizvodima od kojih se, osim osnovne funkcije zadovoljavanja nutritivnih potreba, zahtjeva svojstvo promicanja zdravlja i zaštite od bolesti (Soria i Villamiel, 2010). Primjerice, obogaćivanje kruha bioaktivnim komponentama kao što su prehrambena vlakna i nezasićene masne kiseline može imati blagotvorni učinak na zdravlje (Tarek-Tilistyák i sur., 2013). Zbog toga je važno da metode za preradu hrane omoguće očuvanje nutritivnih i senzorskih kvaliteta kao i bioaktivnost određenih komponenti. Među novim tehnologijama, posebna je pažnja posvećena ultrazvuku (Soria i Villamiel, 2010). Tretman ultrazvukom pokazuje brojne prednosti među kojima su: ekonomska prednost, ekološka prihvatljivost, ušteda energije, moguća poboljšana bioraspoloživost mikronutrijenata pri čemu se zadržavaju njihova izvorna svojstva i dr. (Drmić i Režek Jambrak, 2010; Al Juhaimi i sur., 2017).

Pseudožitarice i žitarice predstavljaju važan izvor makronutrijenata i bioaktivnih komponenti te se mogu koristiti kao namirnice za izradu funkcionalne hrane (Heş i sur., 2014). Kao kvalitetna sirovina za tu svrhu pokazala se heljda (Ahmed i sur., 2014). Heljda sadrži značajnu količinu polifenola te je dobar izvor esencijalnih aminokiselina, prehrambenih vlakana, minerala (Zn, Fe, K i Mg), vitamina (B, C i E), D-kiro-inozitola, karotenoida i fitosterola (Zhu, 2016). Ova pseudožitarica uzgaja se u ograničenim količinama i na malim površinama te je zbog toga slabo iskorištena (Tolaini i sur., 2016). Osim heljde, i proso ima odlične nutritivne karakteristike te se može iskoristiti u prehrani ljudi i time pridonijeti njenoj raznolikosti (Sun i sur., 2014). Sastav prosa čine ugljikohidrati (60 - 70 %), masti (1,5 - 5 %), proteini (7 - 11 %), prehrambena vlakna (2 - 7 %) te je bogat vitaminima i mineralima (Sarita i Ekta Singh, 2016). Iako proso ima blagotvorne učinke, u zapadnim državama je nedovoljno iskorišten u ljudskoj prehrani (Sanderson i sur., 2017).

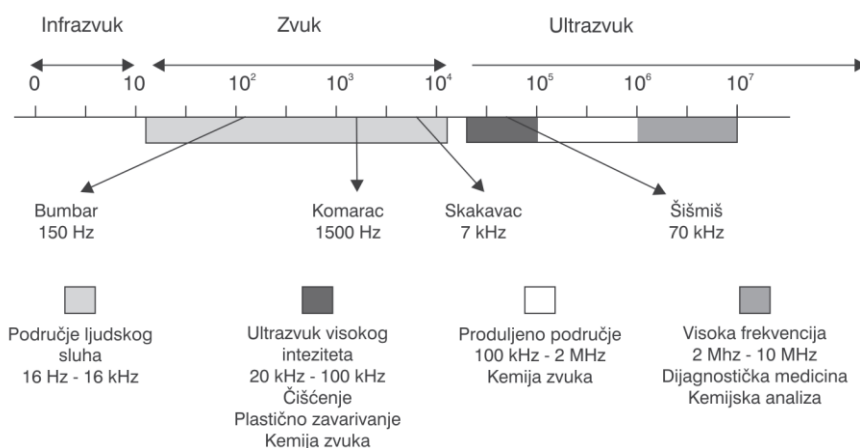
Tijekom prerade različite vrste hrane nastaje otpad koji predstavlja ekološki problem te je za njegovo rješavanje potrebno utrošiti mnogo energije i novca. Kako bi se riješio taj problem pozornost se usmjeruje na smanjenje i iskorištenje otpada odnosno nusproizvoda koji mogu predstavljati izvor bioaktivnih komponenti (Yılmaz i Tavman, 2015., Kowalska i sur., 2017.) Bučina pogača je nusproizvod u proizvodnji bučinog ulja koji je slabo iskorišten u ljudskoj prehrani i uglavnom se koristi kao stočna hrana. Uslijed prisutnosti brojnih blagotvornih komponenti, među kojima su proteini visoko zastupljeni, bučina pogača mogla bi se iskoristiti kao materijal u proizvodnji funkcionalnih proizvoda i dodataka prehrani (Vaštag i sur., 2010).

Cilj ovog rada bio je istražiti nutritivni potencijal prosa i heljde, kao žitarice odnosno pseudožitarice koje nisu u velikoj mjeri zastupljene u prehrani ljudi te bučine pogače, kao nusproizvoda proizvodnje bučinog ulja. Ove sirovine bi zbog svojeg kvalitetnog nutritivnog sastava mogle obogatiti prehranu ljudi i doprinijeti blagotvornom učinku na zdravlje, a njihova dodatna vrijednost je izostanak glutena, zbog čega se također mogu koristiti kao sirovine u prehrani osoba koje boluju od celijakije i intolerancije na gluten. Kako bi se navedene sirovine što bolje iskoristile u svrhu proizvodnje funkcionalnih proizvoda, ultrazvuk visokog intenziteta (UVI) se koristio kao metoda tretmana uzoraka. Prethodno je istražen utjecaj UVI na oslobađanje bioaktivnih spojeva iz navedenih sirovina (Braje, 2017), dok je u ovom radu ispitan učinak tretmana UVI na nezasićene masne kiseline te netopljiva i topljiva prehrambena vlakna. Istraživanjem se željelo utvrditi kako UVI utječe na povećanje količine raspoloživih sastojaka (prehrambena vlakna), odnosno u kojoj mjeri utječe na njihovu degradaciju, posebice na sadržaj i sastav nezasićenih masnih kiselina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 ULTRAZVUK U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Ultrazvuk se definira kao zvučni val frekvencije iznad 20 kHz te ga ljudsko uho ne može čuti (Herceg i sur., 2009; Awad i sur., 2012). Frekvencija ultrazvuka previsoka je za ljudsko slušno područje koje se proteže u rasponu od 16 Hz do 16 kHz. Prikaz podjele zvuka prema frekvencijama i primjeri moguće primjene prikazani su na slici 1.



**Slika 1.** Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Herceg i sur., 2009)

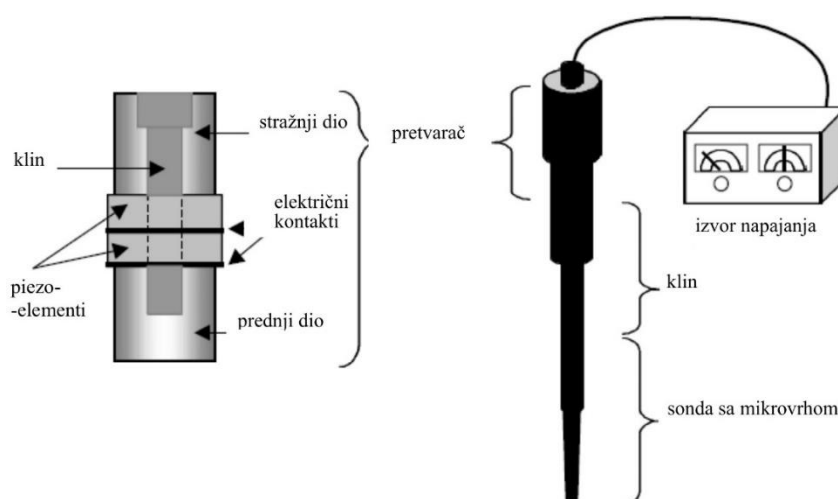
#### 2.1.1. Podjela i primjena

Na temelju frekvencijskog raspona, primjena ultrazvuka u procesu prerade, analize i kontrole kvalitete hrane dijeli se na ultrazvuk niskog i visokog intenziteta (Awad i sur., 2012). Glavna razlika između dvije skupine navedenih valova očituje se u rezultatima njihovog djelovanja (Musielak i sur., 2016). Ultrazvuk niskog intenziteta djeluje u frekvencijskom rasponu iznad 2 MHz te mu je intenzitet manji od 1 W cm<sup>-2</sup> (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Ova tehnika uzrokuje minimalne fizičke i/ili kemijske promjene svojstava hrane te se koristi kao nedestruktivna tehnika u cilju dobivanja podataka o fizikalno-kemijskim svojstvima, strukturi, sastavu i koncentraciji tvari u hrani, kontroli pakiranja, razini kapljevine u bačvama ili tankovima (Herceg i sur. 2009; Charoux i sur., 2017). Ultrazvuk niskog intenziteta primjenjuje se u procjeni sastava sirovih i fermentiranih mesnih proizvoda, ribe i peradi, kontroli kvalitete svježeg voća i povrća, kruha i proizvoda od žitarica, smrznute hrane, procesu proizvodnje sira, otkrivanju krivotvorenja meda, procjeni agregacije, veličine i vrste proteina i dr. (Awad i sur., 2012). Ultrazvuk visokog intenziteta djeluje u frekvencijskom rasponu 20 - 100 kHz te mu

intenzitet iznosi  $1 - 1000 \text{ W cm}^{-2}$  (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Primjena ultrazvuka visokog intenziteta uzrokuje fizičke, mehaničke, kemijske / biokemijske promjene te se primjenjuje u procesima proizvodnje, konzerviranja i sigurnosti hrane (Awad i sur., 2012). U prehrambenoj industriji još se koristi za promjenu viskoznosti, stvaranje emulzija, uzrokuje pucanje stanica, agregaciju suspenzija, polimerizaciju, degaziranje tekuće hrane, ekstrakciju enzima i proteina, inaktivaciju mikroorganizama, rezanje, poboljšavanje procesa zamrzavanja i odležavanja, kristalizaciju, filtraciju, pasterizaciju, sterilizaciju, sušenje i dr. (Musielak i sur., 2016).

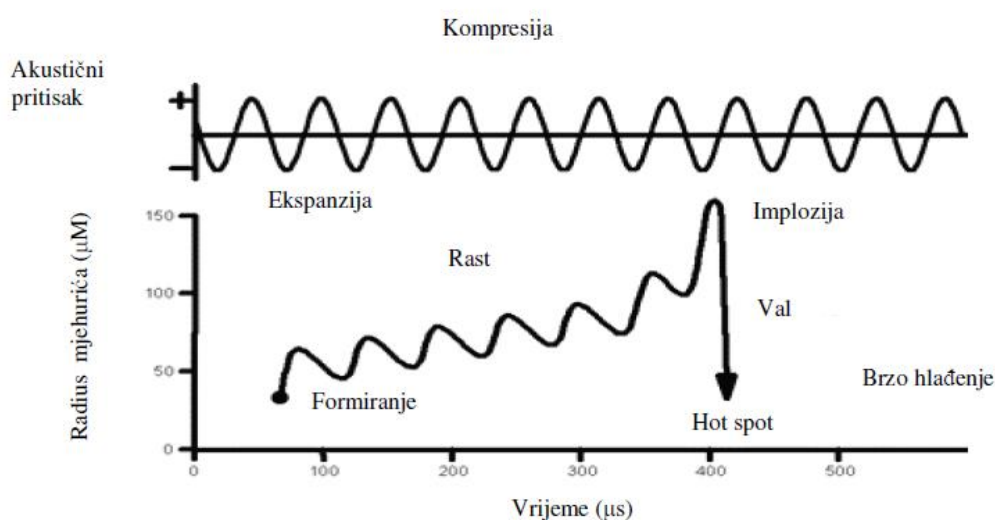
### 2.1.2. Mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta

Ultrazvuk visokog intenziteta može se stvoriti pokretanjem tekućine, mlazom plina ili pomoću električne snage, koji je ujedno i najčešće upotrebljavani način u sustavu prehrambene industrije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Ultrazvučni pretvarač pretvara električnu ili mehaničku energiju u energiju zvuka. Tri su tipa pretvarača u uobičajenoj upotrebi- pretvarač s tekućinom, magnetostriktivni i piezoelektrični pretvarač koji se najčešće koristi. Specifičan tip ultrazvučnog pretvarača se sastoji od dva diska piezoelektrične keramike složene poput sendviča između dva identična metalna bloka. Dva diska se polariziraju u suprotnim smjerovima i razdvajaju elektrodom spojenom na izvor snage. Dijelovi se izlažu predstresu klinom. Piezoelektrični materijali kao što je barijev titanat ili olovov metaniobat se šire i kontrahiraju u promjenjivom električnom polju te se na taj način stvaraju ultrazvučni valovi koji se sondom emitiraju u medij (Režek Jambrak i sur, 2010; Drmić i Režek Jambrak, 2010). Piezoelektrični elementi koji se upotrebljavaju u ultrazvučnim pretvaračima mogu biti krhki pa se ugrađuju između metalnih blokova (prednji i stražnji dio, slika 2) (Režek Jambrak i sur, 2010).



**Slika 2.** Ultrazvuk visokog intenziteta u obliku sonde s piezoelektričnim pretvaračem u obliku “sendviča” (Režek Jambrak i sur., 2010)

Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij dolazi do nastanka longitudinalnih valova te se javljaju područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka. Formiraju se milijuni mikroskopskih mjehurića. Zbog oscilacije tlaka u mediju, mjehurići osciliraju te u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje u fazi kompresije (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Kada veličina mjehurića dosegne kritičnu vrijednost, oni se raspadaju tijekom ciklusa kompresije i stvara se prolazna vruća točka (hot spot) što je prikazano na slici 3. Raspadom kavitacijskih mjehurića stvaraju se ekstremni lokalni uvjeti koji uključuju povećanje temperature i tlaka čije se vrijednosti procjenjuju na 5000 - 5050 K i 50 - 5000 atm. Ovi uvjeti mogu dramatično ubrzati kemijsku reaktivnost medija (Režek Jambrak i sur., 2010; Pingret i sur., 2013; Chemat i sur, 2017). Zbog fenomena kavitacije tretman ultrazvukom se primjenjuje u brojnim procesima u prehrambenoj industriji (Pingret i sur., 2013).



**Slika 3.** Usporedba ciklusa kompresije i ekspanzije sa formiranjem, rastom i implozijom kavitacijskog mjehurića (Drmić i Režek Jambrak, 2010)

### 2.1.3. Učinci ultrazvuka visokog intenziteta

Ultrazvučna obrada predstavlja određeni broj parametara koje je potrebno pažljivo proučiti zbog njihovog mogućeg utjecaja na proces. Osim parametara koji su povezani sa ultrazvučnim uređajem kao što su frekvencija, valna duljina i amplituda vala, ultrazvučna snaga i posljedični intenzitet također utječu na proces i mogu biti optimizirani. Dizajn reaktora kao i oblik sonde također utječu na proces (Pingret i sur, 2013). Ultrazvuk se može primjenjivati u mediju kruto/tekuće ili kruto/plinovito, ali se uglavnom primjenjuje u sistemu kruto/tekuće. Sistem kruto/plinovito nije čest zato jer neusklađenost impendacije i apsorpcija zraka otežavaju prijenos ultrazvuka. Kao otapala, danas se za ekstrakciju preferiraju ekološki prihvatljiva kao

što su mješavina alkohola i vode (Esclapez i sur., 2011). Ovisno o procesu za koji se ultrazvuk koristi, kemijski učinci mogu predstavljati prednost ili nedostatak (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Iako tretman ultrazvukom može izazvati pozitivne učinke na kvalitetu parametara hrane, istraživanja su pokazala da tretman također može uzrokovati promjene nekih parametara hrane koji mogu dovesti do lošijeg prihvatanja konačnog proizvoda. Dolazi do negativne promjene okusa, boje, povećanog sadržaja šećera, degradacije antioksidativnih komponenti i lipida te nastajanja hidroksilnih radikala (Soria i Villamiel, 2010; Pingret i sur., 2013).

Kao što je navedeno ranije, primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji je česta i koristi se za različite procese. U daljnjem tekstu navedeno je nekoliko primjera i učinaka ultrazvuka kroz znanstvena istraživanja.

Ultrazvučna ekstrakcija ima široku upotrebu i dobro utvrđenu metodu rada (Ashokkumar, 2015). U radu Tian i sur., 2013. uspoređivana je ekstrakcija masnih kiselina iz sjemenki nara na tri različita načina: tradicionalnom ekstrakcijom po Soxhletu sa heksanom kao otapalom, ekstrakcija superkritičnim CO<sub>2</sub> te ultrazvučna ekstrakcija. Sastav i količina nezasićenih masnih kiselina u sva tri slučaja određeni su plinskom kromatografijom. Rezultati su pokazali da je ultrazvučna ekstrakcija najučinkovitija za ekstrakciju ulja iz sjemenki nara jer je prinos iznosio 25,11 % te je bio značajno veći od ekstrakcije po Soxhletu (20,50 %) i ekstrakcije superkritičnim CO<sub>2</sub> (15,72 %).

Santos Júnior i sur. (2014) su koristili ultrazvuk kao metodu za transesterifikaciju masnih kiselina pri čemu su za optimizaciju i validaciju metode koristili rafinirano sojino ulje koje je tretirano u ultrazvučnoj kupelji pri frekvenciji od 42 kHz te je optimizacija metode trajala 11, 72 minute. Razvijena metoda primijenjena je na uzorku sardine te se rezultati nisu statistički razlikovali u usporedbi sa metodom prema Josephu i Ackmanu. Time je razvijena nova metoda koja je brza i na učinkovit način se može koristiti za određivanje masnih kiselina u uzorcima sa viskom udjelom slobodnih masnih kiselina (10 %) i vlage (5 %) bez rizika oksidacije sastojaka tijekom procesa.



## 2.2. PREHRAMBENA VLAKNA

### 2.2.1. Definicija, podjela i prehrambeni izvori

Prehrambena vlakna su jestivi dijelovi biljaka ili analogni ugljikohidrati koji nisu probavljivi niti se apsorbiraju u tankom crijevu čovjeka, dok se u debelom crijevu djelovanjem bakterija djelomično ili potpuno fermentiraju te time pozitivno utječu na zdravlje (DeVries, 2003; Gyurova i Enikova, 2015). Postoji više različitih kriterija podjele prehrambenih vlakana te se ona dijele prema ulozi u biljci, vrsti polisaharida, gastrointestinalnoj topljivosti, mjestu probave, produktima probave i fiziološkoj ulozi (Dhingra i sur., 2012). Najšire prihvaćena podjela je prema topljivosti i/ili fermentabilnosti. U netopljiva prehrambena vlakna uglavnom se svrstavaju sastojci stanične stijenke (celuloza, lignin, hemiceluloza), dok su topljiva necelulozni polisaharidi (pektin, gume, sluzi) (Dhingra i sur. 2012; Dai i Chau, 2017). Lako fermentabilna vlakna većinom su topljiva u vodi dok su ona djelomično ili manje fermentabilna netopljiva (Fuller i sur., 2016). Količina i sastav vlakana su različiti, ovisno o namirnicama. Prehrambena vlakna prirodno su prisutna u žitaricama, povrću, voću, orašastom voću, sjemenkama i mahunarkama. Prehrana bogata vlaknima ima manju energetsku vrijednost, često ima manji sadržaj masti, volumno je veća te bogatija mikronutrijentima (Dhingra i sur., 2012). Podjela prehrambenih vlakana prema topljivosti/fermentabilnosti i njihovi prehrambeni izvori prikazani su u tablici 1, dok je u tablici 2 prikazana količina netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana iz različitih izvora.

**Tablica 1.** Podjela prehrambenih vlakana prema topljivosti/fermentabilnost i prehrambeni izvori (Dhingra i sur., 2012; Yangilar, 2013)

Karakteristike	Komponente vlakana	Glavni prehrambeni izvori
netopljiva prehrambena vlakna/manje fermentabilna	celuloza	korjenasto povrće, grašak, šećerna repa, mekinje, cjelovite žitarice, jabuke
	hemiceluloza	cjelovite žitarice, mekinje
	lignin	drvenaste biljke, povrće, brašno
topljiva prehrambena vlakna/lako fermentabilna	pektin	voće, povrće, leguminoze, šećerna repa, krumpir, cjelovite žitarice
	gume	sjemenke mahunarki (guar, rogač) ekstrakti morskih algi (karagenan, alginati) mikrobne gume (ksantan, gelan) zobena kaša, mahunarke
	sluzi	biljni ekstrakti (akacija guma, karaja guma, tragakant guma), prehrambeni aditivi

**Tablica 2.** Količina netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana i prehrambeni izvori (Dhingra i sur., 2012)

Izvor	Prehrambena vlakna (g 100 g <sup>-1</sup> jestivog dijela)		
	Ukupna	Netopljiva	Topljiva
<b>Žitarice</b>			
Ječam	17,3	-	-
Kukuruz	13,4	-	-
Zob	10,3	6,5	3,8
Riža (suha)	1,3	1,0	0,3
Riža (kuhana)	0,7	0,7	0,0
Pšenica (cjelovitog zrna)	12,6	10,2	2,3
Pšenične klice	14,0	12,9	1,1
<b>Mahunarke</b>			
Zeleni grah	1,90	1,40	0,50
Soja	15,0	-	-
Grašak, zeleni, smrznuti	3,5	3,2	0,3
Grah, konzervirani	6,3	4,7	1,6
Leća	11,4	10,3	1,1
Lima grah, konzervirani	4,2	3,8	0,4
Bijeli grah (sirov)	17,7	13,4	4,3
<b>Povrće</b>			
Krumpir	1,30	1,0	0,30
Gorka dinja	16,6	13,5	3,1
Cikla	7,8	5,4	2,4
Lišće piskavce	4,9	4,2	0,7
Okra	4,3	3,0	1,3
Špinat, sirov	2,6	2,1	0,5
Repa	2,0	1,5	0,5
Rajčica, sirova	1,2	0,8	0,4

Mladi luk, sirov	2,2	2,2	0,0
Patlidžan	6,6	5,3	1,3
Krastavci, oguljeni	0,6	0,5	0,1
Cvjetača, sirova	1,8	1,1	0,7
Celer, sirovi	1,5	1,0	0,5
Mrkva, sirova	2,5	2,3	0,2
Brokula, sirova	3,29	3,00	0,29
Voće			
Jabuka, neoguljena	2,0	1,8	0,2
Kivi	3,39	2,61	0,80
Mango	1,80	1,06	0,74
Ananas	1,20	1,10	0,10
Nar	0,60	0,49	0,11
Lubenica	0,50	0,30	0,20
Grožđe	1,2	0,7	0,5
Naranča	1,8	0,7	1,1
Šljiva	1,6	0,7	0,9
Jagoda	2,2	1,3	0,9
Banana	1,7	1,2	0,5
Breskva	1,9	1,0	0,9
Kruška	3,0	2,0	1,0
Orašasto voće i sjemenke			
Bademi	11,20	10,10	1,10
Kokos, sirov	9,0	8,5	0,5
Kikiriki, prženi	8,0	7,5	0,5
Indijski oraščić	6,0	-	-
Sjemenke sezama	7,79	5,89	1,90
Lanene sjemenke	22,33	10,15	12,18

### 2.2.2. Utjecaj na zdravlje

Preporučeni dnevni unos prehrambenih vlakana ovisi o dobi i cjelokupnom zdravstvenom stanju. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i Organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO)

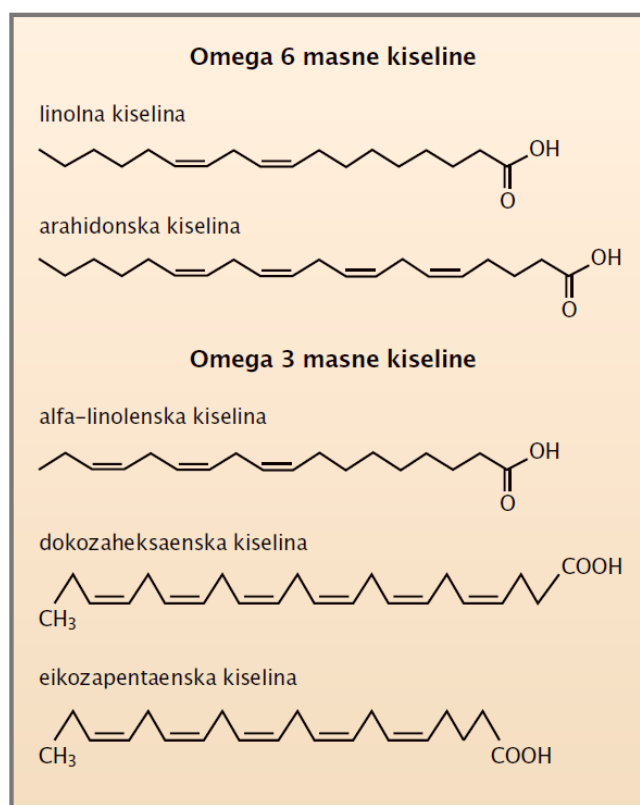
preporučuju dnevni unos od najmanje 25 g na dan za odrasle osobe. Preporuke se baziraju na ulozi vlakana u reguliranju rada crijeva (Benitez-Páez i sur., 2016; Ljubičić i sur., 2017). Uključivanjem vlakana u prehranu, ona pokazuju različite fiziološke učinke koji su povezani sa probavnim traktom, dijabetesom te bolestima srca (Mudgil i Barak, 2013). Mnoge studije su istaknule da netopljiva kao i topljiva prehrabena vlakna pokazuju sposobnost pozitivnog učinka na gastrointestinalni trakt ljudi na različite načine (Dai i Chau, 2017). Smatra se da su tri glavna mehanizma odgovorna za blagotvorne učinke prehrabenh vlakana- povećanje mase, viskoznost i fermentacija. Obično netopljiva vlakna povećavaju masu stolice, ublažavaju zatvor i poboljšavaju pravilnost probave (Dai i Chau, 2017). Topljiva prehrabena vlakna, koja su lako fermentabilna mogu povećati masu stolice poticanjem rasta crijevne mikrobiote te tako pokazuju potencijalni prebiotički karakter (Yangilar, 2013; Dai i Chau, 2017). Zbog neprobavljivosti, prehrabena vlakna ulaze nepromijenjena u proksimalni dio debelog crijeva gdje služe kao glavni izvor energije za anaerobne bakterije čija fermentabilna aktivnost utječe na stvaranje organskih kiselina (mliječne i jantarne) i kratkolančanih masnih kiselina (acetata, propionata i butirata) koje imaju glavnu fiziološku ulogu. Uloga vlakana u debelom crijevu je omekšavanje konzistencije i povećanje mase stolice te učestalosti defekcije što utječe na prevenciju konstipacije, divertikulitisa i raka debelog crijeva (Mudgil i Barak, 2013; Benítez-Páez i sur., 2016). Iako su topljiva vlakna slabije zastupljena u hrani nego netopljiva, vjeruje se da imaju važne učinke na probavne i apsorpcijske procese (Yangilar, 2013). Brojna epidemiološka istraživanja podupiru zaštitni učinak prehrane bogate prehrabenh vlaknima sa niskim glikemijskim indeksom kod osoba oboljelih od dijabetesa tipa 2 (Kendall i sur., 2010). Pretpostavlja se da neka prehrabena vlakna povećavaju viskozitet i odgađaju pražnjenje želuca te to utječe na umjereno i produljeno postprandijalno oslobađanje glukoze u cirkulaciju čime se smanjuje odgovor na inzulin, dok kratkolančane masne kiseline koje nastaju fermentacijom u debelom crijevu potiču osjetljivost na inzulin. Drugi mehanizam kojim vlakna povećavaju osjetljivost na inzulin je indukcija sinteze glukagon sličnog peptida (GLP-1) koji utječe na odgađanje pražnjenja želuca, inhibira lučenje glukagona, stimulira lučenje inzulina te smanjuje proizvodnju glukoze u jetri što zajednički može djelovati na smanjenje potrebe za inzulinom (Li i Uppal, 2010). Brojna epidemiološka i klinička istraživanja su pokazala da prehrabena vlakna imaju izravni učinak na smanjenje rizika od bolesti srca (Kendall i sur., 2010). Meta-analiza koja je obuhvatila 627 408 ispitanika pokazala je inverznu povezanost unosa prehrabenh vlakana sa incidencijom i smrtnosti od koronarnih bolesti srca. Mehanizmi koji objašnjavaju takav utjecaj vlakana su: modifikacija lipidnog profila - smanjenje ukupnog kolesterola, triglicerida i oksidacije LDL-kolesterola, smanjenje razine glukoze u krvi

usporavanjem intestinalne apsorpcije i povećanjem osjetljivosti na inzulin, smanjenje krvnog tlaka, povećanje održivosti endotela koronarnih arterija te smanjenje stvaranja unutarstaničnih reaktivnih kisikovih čestica (Wu i sur., 2014). Potencijalni negativni učinci vlakana uključuju smanjenje apsorpcije minerala konzumiranjem namirnica koje u svom sastavu sadrže i fitate (s druge strane vlakna mogu poboljšati apsorpciju minerala zbog smanjenja pH vrijednosti do kojeg dolazi fermentacijom u debelom crijevu) te nuspojave u gastrointestinalnom traktu - proizvodnja plinova i nadutost (Li i Uppal, 2010; Mudgil i Burak, 2013).

## **2.3. NEZASIĆENE MASNE KISELINE**

### **2.3.1. Podjela i prehrambeni izvori**

Masne kiseline se sastoje od ugljikovodičnog lanca koji sadrži metilnu grupu i terminalnu karbonilnu grupu. Njihove značajke prvenstveno su određene strukturom stoga se masne kiseline dijele na zasićene - bez dvostrukih veza (SFA), mononezasićene - sa jednom dvostrukom vezom (MUFA) i polinezasićene - sa dvije ili više dvostrukih veza (PUFA) (Roche, 1999). Nezasićene masne kiseline se javljaju u dvije različite geometrijske konfiguracije, *cis* i *trans*. U *cis*-konfiguraciji atomi vodika se nalaze s iste strane, dok se u *trans*-konfiguraciji nalaze sa suprotne strane dvostruke veze (Roche, 1999; Schwingshackl i Hoffmann, 2012). Oleinska kiselina je jedna od najreprezentativnijih mononezasićenih n-9 masnih kiselina te je ujedno i najprisutnija MUFA u prehrani sa zastupljenošću oko 90 % od svih MUFA (Schwingshackl i Hoffmann, 2012; Galán-Arriero i sur., 2017). Količinski je najviše zastupljena u biljnim uljima (uljana repica, badem i kikiriki) kao i životinjskim tkivima te je glavni sastojak bioloških membrana (Delgado i sur., 2017). Mediteranska prehrana je poznata kao prehrana s visokim unosom maslinovog ulja koje je izvor oleinske kiseline, dok je još zastupljena u crvenom mesu, punomasnom mlijeku, orašastom voću i drugom voću sa visokim udjelom masti kao što su masline i avokado (Orsavova i sur., 2015). PUFA se dijele u dvije kategorije (n-6 i n-3 masne kiseline, slika 4) koje ljudi ne mogu sintetizirati te su one esencijalne i potrebno ih je unositi prehranom. Linolna kiselina (LA, 18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenska (ALA, 18:3n-3) su glavne esencijalne nezasićene masne kiseline (Roche, 1999). Brojne različite sjemenke i njihova ulja sadrže znatne količine ALA te u tu skupinu spadaju laneno ulje, ulje uljane repice i soje te orasi. U manjim količinama još je prisutna u ulju kukuruza, suncokretovom ulju i ulju šafranike, dok su navedena ulja glavni izvori LA (Calder, 2012). LA je također prisutna u drugim biljnim uljima - ulju kikirikija, sjemenki pamuka, sjemenki grožđa, sjemenki konoplje, pšeničnih klica, bučinom ulju te u margarinu, orasima, kikirikiju i brazilskim oraščićima (Russo, 2009; Orsavova, 2015).

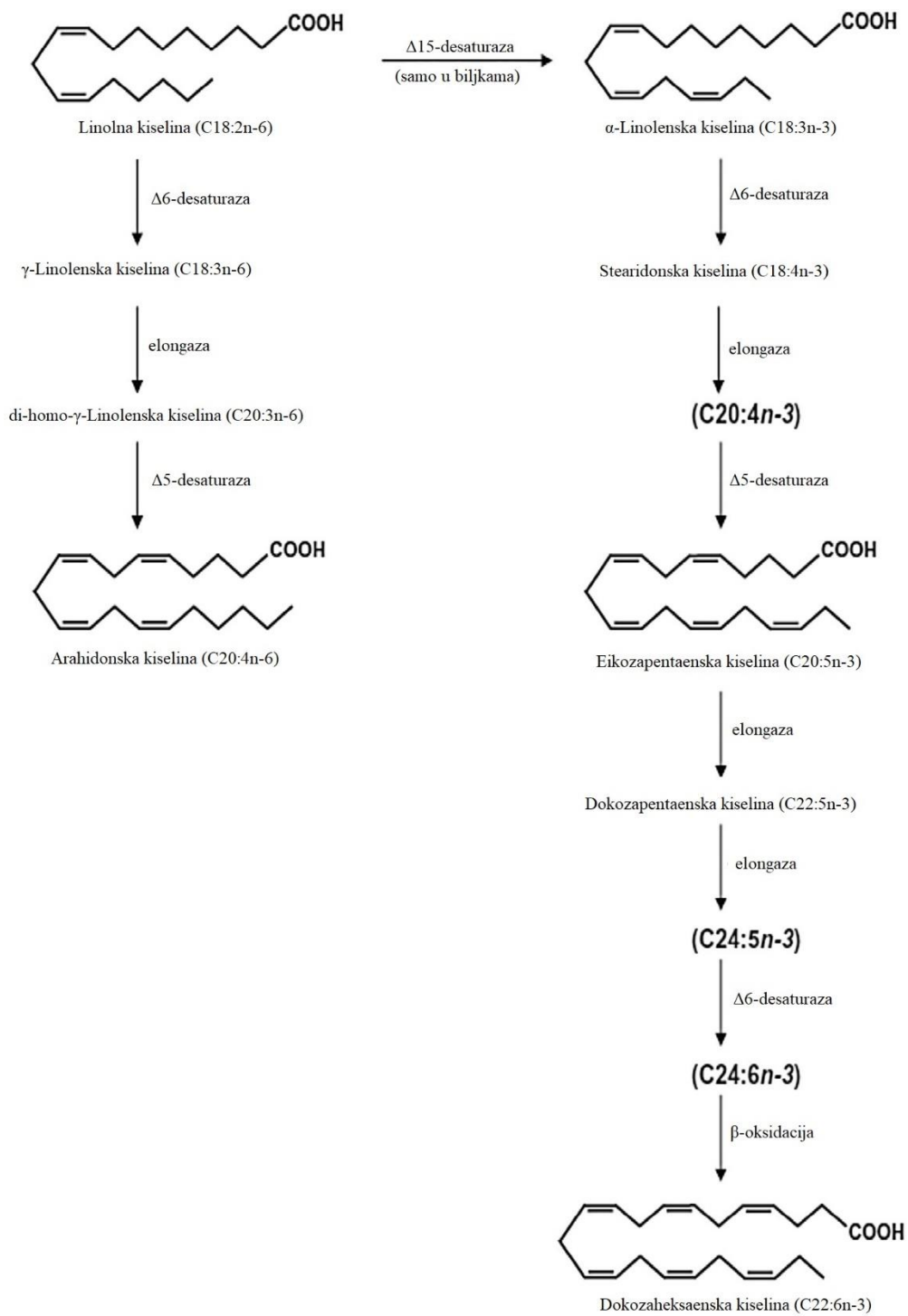


**Slika 4.** Kemijska struktura omega 6 i omega 3 masnih kiselina (Vranešić Bender, 2011)

### 2.3.2. Utjecaj na zdravlje

Masne kiseline sve su više prepoznate kao glavni biološki regulatori koji su povezani sa zdravstvenim statusom te pokazuju brojne važne uloge u staničnoj funkciji. Pravilna prehrana je ona koja osigurava ravnotežu unosa n-6 i n-3 PUFA (Dunbar i sur., 2014). Esencijalne masne kiseline se smatraju funkcionalnom hranom i nutraceuticima. Brojna istraživanja su pokazala da imaju značajnu ulogu u mnogim biokemijskim putevima koji rezultiraju kardioprotektivnim djelovanjem zbog antiaterogenog, antitrombotskog, protuupalnog, antiaritmijškog i hipolipidemijskog učinka te smanjuju rizik kardiovaskularnih bolesti, raka, osteoporoze i dijabetesa. Vidljiv je njihov utjecaj na koncentraciju lipoproteina, fluidnost bioloških membrana, funkciju membranskih proteina i receptora, regulaciju krvnog tlaka i metabolizam minerala (Orsavova i sur., 2015). Linolna i  $\alpha$ -linolenska masna kiselina se natječu za isti enzim ( $\Delta$ -6 desaturazu) sa svrhom pretvorbe u arahidonsku (AA) odnosno eikozapentaensku (EPA) i dokozaheksaensku (DHA) masnu kiselinu (Naughton i sur., 2016), čija sinteza je prikazana na slici 5 (Dunbar i sur., 2014). Dokazano je da je afinitet  $\Delta$ -6 desaturaze veći za ALA nego LA (Orsavova i sur., 2015). Različita istraživanja pokazuju različite postotake pretvorbe ALA u DHA (0,01 - 10 %) iz čega slijedi da je pretvorba ograničena pa je prehrambene izvore EPA i DHA potrebno uvrstiti u prehranu te se navodi da je kod odraslih osoba postotak pretvorbe

znatno niži u usporedbi sa malom djecom. (Brenna i sur., 2009; Swanson i sur., 2012; Dunbar i sur., 2014). EPA i DHA su n-3 dugolančane masne kiseline te su u velikim količinama prisutne u ribi (losos, haringa i pastrva) i školjkama te suplementima ribljeg ulja, a važne su zbog povoljnog učinka na kardiovaskularnu i kognitivnu funkciju (Russo, 2009; Swanson i sur. 2012). Povećanje unosa LA važan je čimbenik koji utječe na zdravstveni status zbog sposobnosti smanjenja ugradnje n-3 PUFA u fosfolipidnu membranu. Važno je naglasiti da visoke razine LA smanjuju pretvorbu ALA u DHA i EPA. Iako obje vrste, i n-6 i n-3 masne kiseline mogu biti prekursori upalnih medijatora, produkti n-3 masnih kiselina imaju slabija upalna svojstva, a u nekim slučajevima su i protuupalni (Naughton i sur., 2016). Eikozanoidi koji se sintetiziraju iz EPA koja može biti sintetizirana nakon unosa ALA, pokazuju suprotna svojstva eikozanoidima koji su izvedeni iz arahidonske kiseline (AA). Eikozanoidi izvedeni iz AA uključuju prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), i leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) te su oni jaki vazokonstriktori i utječu na agregaciju trombocita. S druge strane eikozanoidi sintetizirani iz EPA, uključujući prostaglandin E<sub>3</sub> (PGE<sub>3</sub>), tromboksan A<sub>3</sub> (TXA<sub>3</sub>) i leukotrien B<sub>5</sub> (LTB<sub>5</sub>) slabije utječu na agregaciju trombocita te pokazuju slabiju kemotaktičku aktivnost. Brojna istraživanja su pokazala zaštitnu ulogu n-3 PUFA kod upalnih bolesti crijeva zbog protuupalnih svojstava (Reifen i sur., 2015). Mononezasićene masne kiseline imaju zaštitnu ulogu i usporavaju napredovanje koronarnih bolesti srca (Mahalle i sur., 2016). Povećani unos jednostruko nezasićenih n-9 masnih kiselina je povezan sa smanjenjem bijesa i razdražljivosti, dok pridržavanje mediteranske prehrane koja je bogata oleinskom kiselinom utječe na smanjenje boli kod osoba sa upalnim artritismom (Galán-Arriero i sur., 2017).



**Slika 5.** Biosintetski putevi n-6 i n-3 polinezasićenih masnih kiselina (Dunbar i sur., 2014)



## 2.4. SASTOJCI ZA PROIZVODNJU FUNKCIONALNIH PROIZVODA

### 2.4.1. Bučina pogača

Bučina pogača (slika 6) je nusproizvod u industriji jestivih ulja koji zaostaje nakon ekstrakcije ulja, ali je nedovoljno iskorištena u ljudskoj prehrani. Tradicionalno se koristi kao stočna hrana i gnojivo za tlo (Teh i Bekhit, 2015).



**Slika 6.** Bučina pogača (Anonymous 1)

#### 2.4.1.1 *Kemijski sastav*

Bučine koštice, iz kojih se dobiva pogača su odličan izvor proteina te ulja koje je bogato nezasićenim masnim kiselinama te uglavnom sadrži linolnu i oleinsku masnu kiselinu (Lazos, 1992; Milovanović i sur., 2014). Udio ulja, koji zaostaje nakon ekstrakcije iznosi 8,2 %, dok je udio ukupnih vlakana 23,2 %. (Tarek-Tilistyák, 2014). Ukupni udio ugljikohidrata varira između 10 % i 20 %, te sadrži znatne količine mineralnih tvari (Milovanović i sur., 2014). Zbog visokog sadržaja proteina (60 – 65 %) bučina pogača se može koristiti za proizvodnju proteinskih izolata ili koncentrata. U svome sastavu također sadrži i fenolne komponente (Vaštag i sur., 2010).

#### 2.4.1.2. *Primjena u proizvodnji prehrambenih proizvoda*

U radu Tarek-Tilistyák i sur., 2014. bučina pogača je korištena kao sastojak za obogaćivanje kruha, zajedno sa pogačom suncokreta, žutog lana i oraha, koji može poslužiti kao alternativni prehrambeni izvor za osobe koje vode računa o svom zdravlju. Pogače se mogu koristiti i za obogaćivanje drugih pekarskih proizvoda i na taj način utjecati na povećanje ponude funkcionalne hrane.

Bučina pogača koristila se kao sastojak muffina u količini od 33 % kao zamjena za pšenično brašno te je time doprinijela povećanoj nutritivnoj vrijednosti. Muffini su bili ponuđeni djeci u starosti 7 - 12 godina, od kojih ih je 71 % okarakteriziralo kao ukusne ili vrlo ukusne (Białek i sur., 2016).

#### 2.4.2. Proso

Proso (slika 7) je važna žitarica u zemljama u razvoju koja pokazuje povoljne karakteristike jer je otporna na sušu, štetočine i bolesti te joj je potrebno kratko vrijeme za rast uspoređujući sa drugim žitaricama (Sarita i Ekta Singh, 2016).



**Slika 7.** Proso (Anonymous 2)

##### 2.4.2.1. *Kemijski sastav*

Sastav prosa čine ugljikohidrati (64,8 %), proteini (12,9 %), masti (3,8 %), vlakna (4,9 %) i minerali (2,4 %). Proso je još izvor fitokemikalija i antioksidanasa (Thilagavathi i sur., 2015). Nutritivni sastav prosa omogućuje njegov blagotvorni utjecaj na zdravlje koji se očituje u antimikrobnim, antioksidativnim i antidijabetičkim svojstvima (Devi i sur., 2014).

##### 2.4.2.2. *Primjena u proizvodnji prehrambenih proizvoda*

U mnogim afričkim i azijskim područjima proso se koristi kao glavni sastojak različite tradicionalne hrane - kruha (fermentirani ili nefermentirani), kaše, grickalice i napitaka koji mogu biti alkoholni ili bezalkoholni (Kalinová, 2007; Saleh i sur., 2013). Glavni proizvodi koji se dobivaju preradom prosa su: oljuštena zrna, brašno i pahuljice za doručak (Kalinová, 2007). Preradom se nastoji povećati nutritivna vrijednost, poboljšati probavljivost i bioraspoloživost nutrijenata i smanjenje anti-nutrijenata (Sarita i Ekta Singh, 2016). Brašno se koristi kao djelomična zamjena za pšenično brašno u pripremi kruha, kolača i tjestenine (Kalinová, 2007). Sanderson i sur. (2017) su upotrijebili rafinirani proso za izradu novog proizvoda te su proizveli kus-kus koji je sadržavao veći udio lipida i prehrambenih vlakana od kus-kusa dobivenog iz pšenice.

### 2.4.3. Heljda

Heljda (slika 8) se svrstava u pseudožitarice zbog sličnosti načina upotrebe i kemijskog sastava sa konvencionalnim žitaricama. Izrazito je ekološki prilagodljiva što joj omogućuje rast u ekstremnim uvjetima (Ahmed i sur., 2014).



**Slika 8.** Heljda (Anonymous 3)

#### 2.4.3.1. Kemijski sastav

Heljda u svom sastavu sadrži brojne komponente, među kojima su prisutni proteini (12 - 18,9 %), polisaharidi (glavna skladišna komponenta je škrob koji je zatupljen u količini 63 – 66 %), prehrambena vlakna (7 %), lipidi (1,5 – 4 %) - koji u svom sastavu sadrže najviše oleinske i linolne masne kiseline, rutin, polifenoli te minerali (2,2 - 3,5 %). Sadržaj varira ovisno o ekološkim čimbenicima (Christa i Soral-Šmietana, 2008). Zabilježeno je da konzumiranje heljde i njezinih proizvoda može utjecati na brojne pozitivne zdravstvene učinke: antioksidativne, hipokolesterolemične, antidijabetičke, antikancerogene, protuupalne te utjecaj na zaštitu od neurodegenerativnih bolesti (Giménez-Bastida i Zieliński, 2015).

#### 2.4.3.2. Primjena u proizvodnji prehrambenih proizvoda

Zrna heljde predstavljaju glavni oblik u kojem se ona konzumira. Oljuštena zrna se koriste kao pahuljice za doručak ili se usitnjavaju u brašno koje se koristi za pripremu pekarskih proizvoda. Pržena zrna, koja su u središnjoj i istočnoj Europi poznata pod nazivom „kaša“ se kuhaju te se koriste kao prilog uz jelo. U pekarskoj industriji se koristi u proizvodnji kruha, kolača, grickalica i rezanaca (Giménez-Bastida i sur., 2015). Moguća je njena primjena i u proizvodnji probiotičkih proizvoda (Matejčková i sur., 2017).

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJAL

U ovom radu kao materijal koristili su se heljda, proso i bučina pogača usitnjeni pomoću električnog mlina sa svrhom određivanja utjecaja tretmana ultrazvukom na udio nezasićenih masnih kiselina te netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana. Navedenim uzorcima također je određen i potpuni kemijski sastav. Bučina pogača i heljda nabavljene su u suradnji sa uljarom „Poljo Posavec“ iz Dunjkovca. Proso je proizvod robne marke K-Bio čija zemlja podrijetla je Njemačka, a kupljen je u trgovačkom lancu Kaufland.

### 3.2. METODE RADA

#### 3.2.1. Kemijski sastav heljde, prosa i bučine pogače

##### 3.2.1.1. *Određivanje količine vode*

Količina vode u heljdi i prosu određuje se metodom koja je određena Pravilnikom o metodama fiz.-kem. analize za žita i mlinske proizvode 74/88 (ICC 110/1), dok se količina vode u bučinoj pogači određuje prema AACC International Method 44 - 15.02.

#### Aparatura i pribor

1. metalna zdjelica sa standardiziranim poklopcem  $\Phi$  55 mm, visine 15 mm, otporne na koroziju
2. električni sušionik, Thermo Scientific, HERATHERM OGS60 (Waltham, SAD)– upotreba sušionika sa prisilnom cirkulacijom zraka je visoko preporučljiva zbog osiguranja efikasnog sušenja i homogenije temperature. Brzina ventilatora mora biti prilagođena sušenju praškastih proizvoda unutar sušionika.
3. eksikator sa silicagelom i indikatorom zasićenosti
4. laboratorijska žlica
5. analitička vaga, osjetljivosti  $\pm 0,001$  g, KERN ALS 220-4N (Balingen, Njemačka)
6. laboratorijski mlinac

#### Postupak rada

U prethodno osušenu i izvaganu metalnu zdjelicu izvaže se 5 - 6 g mljevenog uzorka. Za određivanje količine vode u uzorcima heljde i prosa otvorena zdjelica s uzorkom i poklopcem se stavi u sušionik zagrijan na 130 °C u trajanju od 90 minuta, dok se u uzorak bučine pogače suši na 103 °C do postizanja konstantne mase. Nakon sušenja zdjelica se izvadi iz sušionika, pokrije poklopcem te se stavi hladiti u eksikator. Nakon što se zdjelica s uzorkom ohladi, izvaže

se. Za svaku sirovinu rade se dva paralelna uzorka te se kao rezultat uzima srednja vrijednost. Količina vode u uzorku se prikazuje u postocima, a izračunava se prema formuli:

$$\text{količina vode (\%)} = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m_0} \quad [1]$$

$m_0$  = masa uzorka, u g

$m_1$  = masa uzorka nakon sušenja, u g.

Dobiveni podaci o količini vode u uzorku koriste se za izračun udjela količine suhe tvari, koja se prikazuje u postocima, a izračunava se prema formuli:

$$\text{suha tvar (\%)} = 100 \% - \text{količina vode (\%)} \quad [2]$$

#### 3.2.1.2. Određivanje sadržaja dušika (proteina) po Kjeldahl-u

Sadržaj proteina određuje se prema normi HRN ISO 1871 : 1999 (ISO 1871 : 1975 (E)) ICC 105/2 i metodi AACC Method 46 - 12.

##### Reagensi

1.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , koncentrirana (96 do 98 %), Carlo Erba (Milano, Italija)
2. NaOH, 40 % u destiliranoj vodi - 400 g krutog NaOH, Lach-Ner (Neratovice, Češka)  
se otopi u 600 ml destilirane vode u obrocima (hladi se u hladnoj vodi jer je reakcija izrazito egzotermna). Nakon hlađenja dopuni se destiliranom vodom do 1 l i promiješa se.
3.  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 4 % ( $40 \text{ g l}^{-1}$ ) otopina u destiliranoj prokuhanoj vodi - 80 g borne kiseline, Poch (Gliwice, Poljska) otopi se u otprilike 1500 ml vruće destilirane vode, pomiješa i doda se još vruće vode do otprilike 1800 ml. Otopina se ohladi na sobnu temperaturu i doda se 25 ml bromkrezol-zelene otopine i 17,5 ml metilnog-crvenila. Nadopuni se do 2 l sa destiliranom vodom i promiješa.
4. katalizator : Kjeldahl-ove tablete (bez žive i selen), 115348, Merck (Billerica, SAD)
5. HCl, 0,1 N titrival, Kefo (Sisak, Hrvatska) - pripremi se prema uputi proizvođača titrivala
  - određivanje faktora otopine (F) HCl ( $c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ) s  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 
    - $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se osuši na  $250^\circ\text{C}$  i ohladi se u eksikatoru
    - odvaži se 0,15 - 0,2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  na desetinu miligrama

- otopi se u 100 ml vode
- titrira se kiselinom ( $c = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ) uz metil-crvenilo do promjene boje iz žute u crvenu
- kuhanjem se istjera  $\text{CO}_2$  i ponovno se titrira do crvene boje

Faktor otopine se odredi prema formuli:

$$F = \frac{2 \times 1000 \times m(\text{Na}_2\text{CO}_3) \text{ g}}{V(\text{HCl}) \text{ ml} \times 106,004 \times 0,1} \quad [3]$$

6. obojeni indikator (kada se upotrebljava ručna ili kolorimetrijska titracija)

- metil-crvenilo, 1 %, Kemika (Zagreb, Hrvatska) - otopi se 100 mg u 100 ml 95 % alkohola
- bromkrezol-zeleno, 1%, Kemika (Zagreb, Hrvatska) - otopi se 100 mg u 100 ml 95 % alkohola

7. destilirana voda

Aparatura i pribor

1. laboratorijska vaga, KERN ALS 220-4N (Balingen, Njemačka)
2. uređaj za mineralizaciju, FOSS (Hillerød, Danska)
3. Kjeldahl-ove kivete za mineralizaciju sa stalkom
4. efikasni sistem za odvod pare: aspirator ili pročistač plina ili tekuća voda.
5. uređaj za destilaciju, FOSS (Hillerød, Danska)
6. posudice za vaganje od nikla ili nehrđajućeg čelika
7. 25 ml birete (graduacija = 0,1 ml)
8. 250 ml Erlenmayer tikvice
9. 10 ml dispnzeta za koncentriranu  $\text{H}_2\text{SO}_4$
10. 25 ml dispnzeta za bornu kiselinu

Postupak rada

*Mineralizacija*

U Tecator kivete metodom dvostrukog vaganja stavi se 1 g uzorka. U svaku kivetu se doda 1 tableta Kjeldahl katalizatora i 12 ml konc. sulfatne kiseline te se lagano miješa dok se uzorak potpuno navlaži kiselinom. Nakon toga stalak s epruvetama se stavi u digestijsku jedinicu za mineralizaciju i uključi se sistem za odvod pare. Prvih 10 minuta spaljuje se uz maksimalan protok vode, a nakon toga se protok vode smanji na 50 %. Mineralizacija je završena nakon otprilike 60 minuta, a tekućina u epruvetama je bistra i svjetlo-zelene boje. Epruvete se sa

stalkom izvade iz digestijske jedinice i ostave hladiti zajedno s poklopcem do sobne temperature. Nakon hlađenja u svaku epruvetu stavi se 80 ml destilirane vode.

#### *Priprema prihvatnih tikvica*

Za vrijeme trajanja mineralizacije za svaki uzorak se pripremi jedna Erlenmayer tikvica od 250 ml te se u njih stavi 25 ml borne kiseline i 3 kapi indikatora.

#### *Destilacija*

Uključi se aparat za destilaciju, pusti se voda da se napuni generator pare (ventil ispuštanja vode mora biti zatvoren) te se na postolje predviđeno za prihvatnu tikvicu stavi prazna tikvica, a na mjesto predviđeno za Kjeldhalovu kivetu stavi se prazna kiveta. Pokrene se generator pare. Nakon što se u prihvatnu tikvicu skupi kondenzat, otvore se zaštitna vratašca te se prihvatna tikvica zamijeni tikvicom u koju je stavljeno 25 ml borne kiseline (destilacijska cjevčica mora biti uronjena u otopinu), a Kjeldhalova kiveta se zamijeni kivetom u koju je stavljen spaljeni uzorak i 80 ml destilirane vode te se ponovno zatvore vratašca. Dozira se 50 ml 40 %-tnog NaOH u Kjeldhalovu kivetu i pokrene se destilacija koja se odvija oko 4 minute (do volumena 125 ml). Dobiveni destilat je zelene boje (ukazuje na prisustvo amonijaka) te mora biti hladan jer u protivnom dolazi do gubitka amonijaka. Nakon završetka destilacije, Kjeldhalova kiveta se isprazni u izljev uz obilo puštanje hladne vode, a destilat se titrira kloridnom kiselinom te se zabilježi utrošak.

#### *Titracija kloridnom kiselinom*

Titracija se vrši pomoću birete koja je napunjena 0,1 N HCl-om te se titrira izravno u prihvatnu tikvicu. Titracija je završena kada se boja otopine promijeni u blijedo ružičastu.

#### *Izračun mase proteina*

Masa proteina izračunava se na sljedeći način:

$$\% N = \frac{\{ (a - b) \times N_{\text{kis}} \times f_{\text{kis}} \times 1,4007 \}}{m_{\text{uzorka}}} \quad [4]$$

a = volumen HCl utrošen za titraciju uzorka, u ml

b = volumen HCl utrošen za titraciju slijepe probe, u ml

N = molaritet kiseline

f = faktor kiseline

m = masa uzorka (talog u lončiću nakon sušenja), u g

$$\% \text{ bjelančevina} = \% N \times F \quad [5]$$

F = faktor za preračunavanje dušika u bjelančevine (6,25)

### 3.2.1.3. Ekstrakcija masti po Soxhletu

#### Reagensi

1. petroleter, Carlo Erba (Milano, Italija)

#### Aparatura i pribor

1. aparatura po Soxhletu
2. papirnatu čahure
3. vata
4. staklene kuglice
5. laboratorijska vaga, KERN ALS 220-4N (Balingen, Njemačka)
6. sušionik, Instrumentaria, ST-01/02 (Zagreb, Hrvatska)
7. eksikator

#### Postupak rada

Ekstrakcija masti provodi se u aparaturi po Soxhletu prema metodi HRN EN ISO 650 : 2010. U tikvice sa okruglim dnom se stave 3 staklene kuglice. Na dno papirnate čahure se stavi malo vate te se čahura napuni uzorkom (prethodno osušeni talog) gotovo do vrha, a na vrh se ponovno stavi vata. Čahura s uzorkom se stavi u ekstraktor. Ekstraktor je spojen sa tikvicom koja se nalazi u kupelji, a s gornje strane je spojen na povratno hladilo koje služi za kondenzaciju kapljica otapala koje ponovno pada na uzorak i na taj način se ekstrahira mast. Kao otapalo za ekstrakciju koristi se petroleter koji se ulijeva kroz hladilo u količini da popuni oko 3/4 volumena tikvice. Uzorci se zagrijavaju na 150 °C u trajanju od 8 sati. Mast se skuplja u tikvicu, a višak otapala se izlije iz hladila te otpari iz tikvice. Nakon otparavanja otapala, tikvice s ekstrahiranim mastima se suše u sušioniku na 103 °C u trajanju od 1 sat, te se stave u eksikator na hlađenje i nakon toga se izvažu. Nakon vaganja ekstrahirani uzorci masti se ponovno stave na sušenje u sušionik na 30 minuta te se postupak ponavlja do postizanja konstantne mase.

### 3.2.1.4. Određivanje udjela netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana

Za određivanje udjela prehrambenih vlakana koristi se odmašćeni uzorak. Uzorci se odmaste metodom po Soxhletu koja je opisana u poglavlju 3.2.1.3.

#### Reagensi

1. 96 %-tni etanol, Kefo (Sisak, Hrvatska)
2. 78 %-tni etanol - pripremi se tako da se u odmjernu tikvicu od 1 l stavi 179 ml destilirane vode te se tikvica do oznake napuni 96 %-tnim etanolom
3. aceton, Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska)



4. enzimi, Megazyme International Ireland (Wicklow, Irska) - čuvaju se na temp. 0 - 5 °C
  - termostabilna  $\alpha$ -amilaza (E-BLAAM); 3000 Ceralpha Units ml<sup>-1</sup>
  - proteaza (E-BSPRT); 50 mg mL<sup>-1</sup>; 350 Tyrosine Units ml<sup>-1</sup>
  - amiloglukozidaza (E-AMGDF); 200 pNP  $\beta$ -maltoside Units ml<sup>-1</sup> (ili 3,300 Units ml<sup>-1</sup> on soluble starch)
5. destilirana voda
6. Celite, Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD)
7. otopina za pranje filter lončića, Labex, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
8. 6,0 M otopina NaOH - 24 g NaOH, Lach-Ner (Neratovice, Češka) se stavi u odmjernu tikvicu od 100 ml te se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom
9. otopina MES-TRIS pufera- svaki 0,05 M; pH = 8,2 pri 24 °C
  - priprema - u odmjernoj tikvici od 2 l otopi se 19,52 g 2(N-morfolino)etansumporne kiseline (MES), Acros Organics (New Jersey, SAD) i 12,2 g tris(hidroksimetil)aminometana (TRIS), Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD) u 1,7 l destilirane vode. pH se postavi na vrijednost 8,2 pomoću 6,0 M NaOH te se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom
10. 37 %-tna otopina HCl, Carlo Erba (Milano, Italija)
11. 0,561 M otopina HCl - 9,63 ml 37 %-tne otopine HCl-a se otpipetira u odmjernu tikvicu od 200 ml u koju je prethodno stavljeno oko 100 ml vode te se nadopuni do oznake destiliranom vodom
12. 5 %-tna otopina NaOH (w/w)- u odmjernu tikvicu od 100 ml se stavi 5 g NaOH te se otopi u 95 ml destilirane vode
13. 5 %-tna otopina HCl (v/v)- 12,24 ml 37 %-tne HCl se stavi u odmjernu tikvicu od 100 ml u koju je prethodno stavljeno oko 50 ml destilirane vode te se nadopuni do oznake destiliranom vodom

#### Aparatura i pribor

1. staklene čaše
2. laboratorijske boce, 500 ml i 1 l
3. stakleni filter lončići (50 ml, veličina pora 40 - 60  $\mu$ m)
  - priprema lončića za upotrebu:
    - lončići se stave u mufolnu peć na 525 °C preko noći
    - makne se Celite i pepeo koristeći vakuum

- lončići se stave u Labex, otopinu za pranje na sobnu temperaturu u trajanju od 1 h
  - lončići se ispiru s vodom i destiliranom vodom
  - za zadnje ispiranje koristi se 15 ml acetona i lončići se ostave sušiti na zraku
  - doda se 1 g Celite u posušene lončiće i stavi ih se sušiti na 130 °C u sušionik do konstantne mase
  - lončići se hlade u eksikatoru oko 1 h, nakon toga ih se izvaže i zabilježi se masa
4. boca za odsisavanje, 500 ml
  5. stakleni lijevak za filtraciju
  6. gumeni prsten
  7. izvor vakuuma
  8. vodena kupelj s tresilicom, Stuart, SBS40 (UK)
  9. laboratorijska vaga, KERN ALS 220-4N i KERN KB 2000-2N (Balingen, Njemačka)
  10. staklena menzura, 50 i 500 ml
  11. sušionik, Thermo Scientific, HERATHERM OGS60 (Waltham, SAD)
  12. štoperica
  13. eksikator
  14. pH metar, JENWAY 3510 (UK)
  15. mikropipete (50 - 200 µm i 5 ml) i nastavci, Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
  16. magnetska miješalica, IKA® RT5 (Staufen im Breisgau, Njemačka)
  17. špatula
  18. jednokratna plastična pipeta
  19. mufolna peć

#### Postupak rada

Metoda za analizu netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana modifikacija je AACC 32 - 05.01 metode za određivanje ukupnih prehrambenih vlakana (AACC 32 - 05.01) i AACC 32 - 21.01 metode za određivanje topljivih/netopljivih prehrambenih vlakana.

Shematski prikaz metode određivanja netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana prikazan je u prilogu 2.

### *Određivanje netopljivih prehrambenih vlakana*

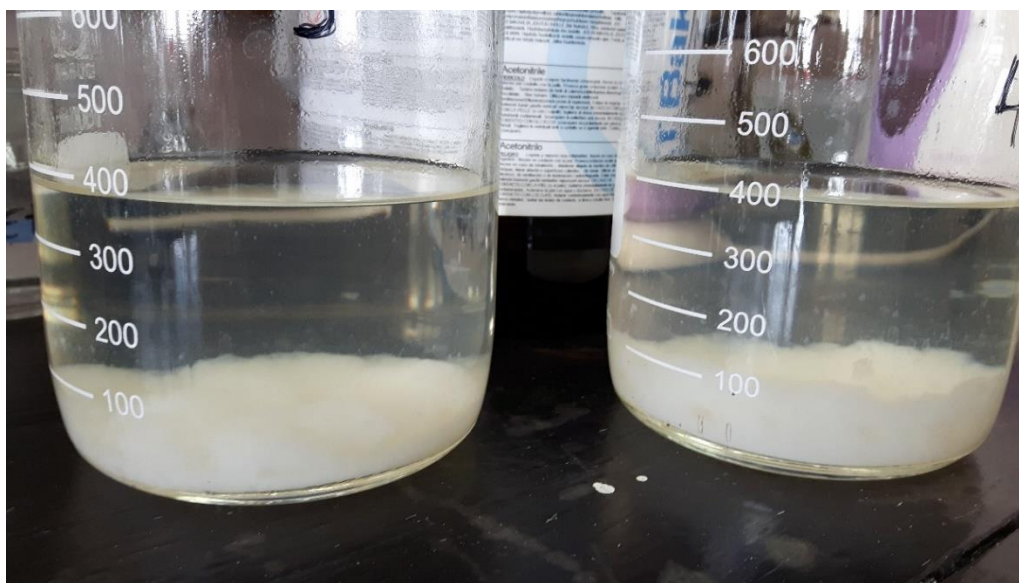
U svaku od četiri laboratorijske boce (500 ml) izvaže se po 1 g prethodno odmašćenog uzorka te se doda 40 ml otopine MES-TRIS pufera. Slijepa proba pripremi se na isti način samo bez uzorka i pripremi se u dvije laboratorijske boce. Nakon dodatka pufera u svaku bocu stavi se magnet te se boce stave miješati na magnetsku miješalicu ( $MOT = 1,5$ ) dok se uzorak ne otopi. U iste boce, miješajući na magnetskoj miješalici, doda se 50  $\mu$ l otopine termostabilne  $\alpha$ -amilaze. Boce se poklope sa čepom (ne zatvara se do kraja), stave u vodenu kupelj sa tresilicom (jačina postavljena na 120) te se konstanto miješaju na 98 – 100 °C i inkubiraju 30 min. (Slijepa proba i kontrolna bučina pogača analizirane su na taj način. Ostali uzorci su se stavili u lonac sa kipućom vodom koja se zagrijavala na rešou te su bili miješani ručno svakih 5 min). Nakon završetka inkubacije uzorci se izvađe iz vodene kupelji i ohlade se na otprilike 60 °C. Sa stijenki boca sastruže se prsten pomoću špatule te se špatula i stijenka isperu sa 10 ml destilirane vode koristeći pipetu. Temperaturu vodene kupelji potrebno je podesiti na 60 °C na način da se iz kupelji odlije nešto vode i doda se hladna voda. U ohlađene uzorke doda se 100  $\mu$ l otopine proteaze te se boce poklope sa čepom (ne zatvara se do kraja) i stave se u vodenu kupelj sa konstantnim miješanjem u trajanju od 30 min. Vrijeme se počne mjeriti kada temperatura u kupelji dosegne 60 °C. Nakon završene druge inkubacije zaustavi se miješanje, a boce se ostave u kupelji kako bi se podesila pH vrijednost na 4,1 - 4,8. U svaku bocu doda se 5 ml 0,561 M otopine HCl-a te se za konačno postavljanje pH vrijednosti dodaje nekoliko kapi (otprilike 5 - 10) 5 %-tne otopine HCl-a pomoću jednokratne plastične pipete. Nakon što se podesi pH vrijednost, u boce se doda po 200  $\mu$ l otopine amiloglukozidaze, poklopi se čepom (ne zatvara se do kraja) i ostavi se inkubirati u vodenoj kupelji sa konstantnim miješanjem na 30 min. Vrijeme se počne mjeriti kada temperatura u kupelji dosegne 60 °C. Završetkom treće inkubacije uzorci idu na vakuum filtraciju. Vakuum filtracija provodi se na način da je boca za odsisavanje spojena na izvor vakuuma te se filtracija vrši preko staklenih lončića. Prije filtracije uzorka potrebno je rasporediti Celite po lončiću koristeći nekoliko mililitara destilirane vode koja se zatim usisa. Lončići s Celitom su prethodno izvagani i zabilježena im je masa. Uzorak iz boca koje su se inkubirale u vodenoj kupelji se filtrira kroz lončić u odsisnu bocu. Talog koji je zaostao u boci se ispire sa 4 x 5 ml destilirane vode koja je zagrijana na 70 °C. Filtrat i voda prebace se iz boce za odsisavanje u čistu, izvaganu laboratorijsku bocu (1 l) te se kasnije koriste za određivanje topljivih prehrambenih vlakana. Talog u lončiću ispere se sa 2 x 10 ml 96 %-tnog etanola i acetona. Nakon ispiranja taloga u lončiću, lončić se stavi u sušionik na 103 °C te se suši preko noći. Osušeni lončić stavi se u eksikator, a nakon hlađenja se izvaže i zabilježi se

masa. Masa taloga izračuna se na način da se oduzme masa lončića i Celita od mase osušenog lončića i Celita sa uzorkom. Za izračun netopljivih vlakana potrebno je odrediti količinu proteina (metoda je opisana u poglavlju 3.2.1.2.) i pepela (metoda je opisana u poglavlju 3.2.1.6.).

#### *Određivanje topljivih prehrambenih vlakana*

Za određivanje topljivih prehrambenih vlakana koristi se uzorak (filtrat i voda) koji je skupljen u prethodno izvaganu laboratorijsku bocu (1 l) prilikom određivanja netopljivih vlakana.

Boca sa skupljenim uzorkom se izvaže te se izračuna masa uzorka. Dobivena masa koristi se za izračun potrebnog volumena 96 %-tnog etanola, zagrijanog na 60 °C koji se dodaje u bocu sa uzorkom u volumenu koji je 4 puta veći od mase uzorka. Nakon dodatka etanola uzorak se ostavi stajati na sobnoj temperaturi 1 h u svrhu taloženja topljivih prehrambenih vlakana (slika 9). Prije filtracije uzorka potrebno je rasporediti Celite po lončiću koristeći nekoliko mililitara (oko 15 ml) 78 %-tnog etanola koji se zatim usisa. Lončići s Celitom su prethodno izvagani i zabilježena im je masa. Uzorak se filtrira kroz lončić. Za kvantitativno prenošenje i ispiranje ostatka taloga iz boca u lončić koristi se špatula i 78 %-tni etanol. Nakon filtracije talog se ispere sa 2 x 15 ml 78 %-tnog etanola, 96 %-tnog etanola i acetona. Isprani talog u lončiću suši se u sušioniku preko noći na 103 °C. Osušeni lončić stavi se u eksikator, a nakon hlađenja se izvaže i zabilježi masa. Masa taloga izračuna se na način da se oduzme masa lončića i Celita od mase osušenog lončića i Celita sa uzorkom. Za izračun topljivih prehrambenih vlakana potrebno je izračunati količinu proteina i pepela na jednak način kao i kod netopljivih prehrambenih vlakana.



**Slika 9.** Fotografija taloženja topljivih prehrambenih vlakana bučine pogače

### 3.2.1.5. Određivanje sadržaja šećera volumetrijski po Luff-Schoorl-u

Sadržaj šećera određuje se prema metodi Egan i sur. (1981).

#### Reagensi

1. reagens za bistrenje po Carrezu

- Carrez I - u odmjernu tikvicu od 100 ml otopi se 21,95 g cinkova acetata ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) ili 24 g cinkova acetata ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) i 3 g ledene (glacijalne) octene kiseline te se dopuni do oznake destiliranom vodom
- Carrez II - u odmjernu tikvicu od 100 ml otopi se 10,6 g kalijeva heksacijanoferata ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$ ) te se dopuni do oznake destiliranom vodom

2. otopina kompleksa bakra po Luff-Schoorlu (Luffov reagens)

- otopina bakrenog sulfata - 25 g bakrenog sulfata ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) ili 16 g bezvodnog bakrenog sulfata se otopi u 100 ml destilirane vode
- otopina limunske kiseline - 50 g limunske kiseline ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ ) otopi se u 50 ml destilirane vode
- otopina natrijeva karbonata- 143 g bezvodnog natrijeva karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ili 338 g kristalnog natrijevog karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ) se otopi u 300 - 400 ml mlake destilirane vode i ohladi se
- priprema u odmjernu tikvicu od 1000 ml stavi se otopina natrijevog karbonata i uz oprezno miješanje doda se otopina limunske kiseline. Miješa se do nastanka ugljikovog dioksida te se doda otopina bakrenog sulfata i dopuni do oznake. Pripremljena otopina se ostavi preko noći i ako je potrebno se filtrira. Kontrolira se molaritet:  $c(\text{Cu}) = 0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ;  $c(1/2 \text{ Na}_2\text{CO}_3) = 2 \text{ mol l}^{-1}$

3. 30 %-tna otopina KJ (kalij jodid) - U odmjernu tikvicu od 100 ml odvaži se 30 g KJ, Carlo Erba (Milano, Italija) te ga je potrebno dobro otopiti i dopuniti destiliranom vodom do oznake. Otopina se priprema na dan korištenja.

4. 6 mol  $\text{l}^{-1}$  otopina  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (sumporna kiselina) - U odmjernu tikvicu od 1000 ml do polovine se stavi destilirana voda. Nakon toga ulije se 323 ml konc. sumporne kiseline, Carlo Erba (Milano, Italija) te je otopinu potrebno ohladiti. Uz hlađenje se dodaje preostala količina destilirane vode do oznake.

5. 0,1 M otopina  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (natrij-tiosulfata) - 25 g natrijevog tiosulfata, Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska) ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$  p.a.) otopi se u odmjernoj tikvici od 1000 ml u prokuhaloj destiliranoj vodi. Nakon toga doda se oko 0,2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ili se koristi titrival

po uputi proizvođača. Otopina se čuva u tamnoj boci i nakon 10 dana otopini se određuje molaritet

6. 2 %-tna otopina škroba - U 1 l vrele vode doda se 5 g topivog škroba izmiješanog sa 30 ml vode. Otopina se kuha 3 minute, ohladi te može dodati 10 mg merkuri joda kao konzervansa.
7. 0,1 mol l<sup>-1</sup> otopina NaOH (natrij hidroksid) - pripremi se prema uputi proizvođača titrivala, Kefo (Sisak, Hrvatska)
8. 0,1 mol l<sup>-1</sup> HCl (kloridna kiselina) - pripremi se prema uputi proizvođača titrivala, Kefo (Sisak, Hrvatska)
9. 1 %-tna otopina fenolftaleina u etanolu - U odmjernu tikvicu od 100 ml odvaži se 1 g fenolftaleina, Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska). Fenolftalein je potrebno dobro otopiti u etanolu i dopuniti etanolom do oznake.
10. koncentrirana HCl (kloridna kiselina), Carlo Erba (Milano, Italija)
11. 1 mol l<sup>-1</sup> otopina NaOH (natrijeva lužina), Kefo (Sisak, Hrvatska)

#### Aparatura i pribor

1. vaga (mjerno područje: 0,1 mg)
2. staklena čaša, 400 ml
3. mlin
4. Bunsenov plamenik
5. azbestna mrežica i tronožac
6. Erlenmayer tikvica s brušenim čepom od 300 ml
7. povratno hladilo
8. odmjerne tikvice od 100, 250 i 1000 ml
9. vodena kupelj
10. pipete od 10 i 25 ml

#### Postupak rada

##### *Kontrola reagensa po Luff-Schoorlu*

- Otpipetira se 25 ml reagensa, doda se 3 g kalijeva jodida i 25 ml 6 mol l<sup>-1</sup> sumporne kiseline. Titrira se 0,1 mol l<sup>-1</sup> otopinom natrijeva tiosulfata, uz prisutnost škroba koji se dodaje pri kraju titracije. Količina utrošenog 0,1 mol l<sup>-1</sup> natrijevog tiosulfata mora iznositi 25 ml (ako ne iznosi 25 ml treba dodati još bakrenog sulfata).
- U odmjernu tikvicu od 100 ml otpipetira se 10 ml reagensa i do oznake se dopuni s vodom. U konusnoj tikvici pomiješa se 10 ml razrijeđenog reagensa sa 25 ml 0,1 mol l<sup>-1</sup> kloridne kiseline i 10 minuta se zagrijava na vreloj vodenoj kupelji. Nakon toga

otopina se ohladi i dopuni svježe prokuhanom vodom do početnog volumena, a zatim se titrira 0,1 mol l<sup>-1</sup> otopinom natrijevog hidroksida uz dodatak fenolftaleina. Količina utrošene otopine natrijevog hidroksida mora iznositi između 5,5 i 6,5 ml.

- Otpipetira se 10 ml razrijeđenog reagensa i titrira se sa 0,1 mol l<sup>-1</sup> otopinom kloridne kiseline, uz dodavanje fenolftaleina do nestanka ljubičaste boje. Količina utrošene otopine klorovodične kiseline mora iznositi između 6 i 7,5 ml.
- pH vrijednost Luffova reagensa na temperaturi od 20 °C iznosi 9,3 - 9,4

#### *Priprema uzorka*

Oko 100 g uzorka se samelje u malom mlinu. U čašu od 400 ml odvaže se 5 - 10 g uzorka i doda se 200 ml vode. Za odstranjivanje balastnih tvari doda se 5 ml otopine Carrez I i 5 ml otopine Carrez II. Nakon svakog dodavanja, sadržaj se dobro pomiješa. Cjelokupna količina se prenese u odmjernu tikvicu od 250 ml, dopuni se do oznake, promiješa i filtrira. To je filtrat I.

#### *Određivanje reduciranih (prirodnih) šećera-prije inverzije*

U odmjernu tikvicu od 100 ml otpipetira se 25 ml filtrata I i do oznake se dopuni destiliranom vodom. U konusnu tikvicu od 300 ml otpipetira se 25 ml Luffove otopine, doda 25 ml razrijeđenog filtrata I (treba sadržavati od 15-60 mg šećera). Konusna tikvica se do vrenja (koje treba započeti nakon dvije minute) zagrijava izravno na plameniku. Vrenje se nastavlja na azbestnoj mrežici s okruglim otvorom promjera 6 - 7 cm, a konusna tikvica se spoji sa povratnim hladilom. Od početka ključanja kuha se točno 10 minuta, nakon čega se sadržaj tikvice hladi pod mlazom vode. Nakon 5 minuta doda se 10 ml otopine KJ i postupno 25 ml 6 mol l<sup>-1</sup> otopine sumporne kiseline. Nakon toga titrira se 0,1 mol l<sup>-1</sup> otopinom natrijeva tiosulfata uz neprekidno miješanje, do pojave žute boje. Zatim se doda nekoliko mililitara škroba i nastavi se titrirati natrijevim tiosulfatom, kap po kap, dok se plava boja potpuno ne izgubi.

U istim se uvjetima mora obaviti i slijepa proba sa istom količinom Luffova reagensa, samo što se umjesto razrijeđenog filtrata I dodaje 25 ml vode.

#### *Određivanje ukupnih reduciranih šećera – nakon inverzije (hidrolize)*

U odmjernu tikvicu od 100 ml otpipetira se 10 ml filtrata I, razrijedi se približno sa 30 ml destilirane vode i doda se 0,5 ml koncentrirane kloridne kiseline. Odmjerna tikvica sa sadržajem se stavi na vrelu vodenu kupelj invertirati 30 minuta, a zatim se neutralizira sa 1 mol l<sup>-1</sup> otopinom natrijevog hidroksida, uz dodatak fenolftaleina kao indikatora. Nakon neutralizacije tikvica se dopuni do oznake destiliranom vodom. Daljnji postupak je isti kao pri određivanju reduciranih šećera.

Ukupni reducirani šećeri izračunavaju se nakon hidrolize.

$$\begin{array}{ccccc} \text{nereducirajući šećer} & = & \text{ukupni reducirani šećer} & - & \text{reducirani šećer} & [6] \\ (\text{invertni šećer}) & & (\text{nakon hidrolize}) & & (\text{prije hidrolize}) \end{array}$$

### *Izračunavanje šećera po Luff-Schoorl-u*

Za izračunavanje šećera koristi se tablica 3 (empirijska).

**Tablica 3.** Izračunavanje šećera po Luff-Schoorl-u (Egan i sur., 1981)

0,1 M tiosulfat mL	Glukoza, fruktoza ili invertni šećer		Laktoza		Maltoza	
	mg	razlika	mg	razlika	mg	razlika
1	2,4	-	3,6	-	3,9	-
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,4	11,0	3,7	11,7	3,9
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	3,9
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	4,0
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	3,9
7	17,2	2,5	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,7	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0
11	27,6	2,6	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,0
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,7	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,8	59,8	4,1
16	41,3	2,8	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,1
18	47,1	2,9	67,7	3,9	72,2	4,2
19	50,0	2,9	71,7	4,0	75,5	4,3
20	53,0	3,0	75,7	4,0	80,9	4,4
21	56,0	3,0	79,8	4,1	85,4	4,5
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2	3,1	88,0	4,1	94,6	4,6

### *Primjer izračuna*

U postupku je odvagano 10 g uzorka, a razrjeđivanje je obavljeno na ovaj način: 10 g razrijeđeno je do 250 ml, od toga je otpipetirano 10 ml i razrijeđeno do 100 ml. Za konačni postupak otpipetirano je 25 ml.

### *Određivanje ukupnih reduciranih šećera – nakon inverzije (hidrolize) - primjer*

Za titraciju slijepe probe (SP) utrošeno je 24,9 ml 0,1 mol l<sup>-1</sup> otopine Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, a za titraciju pokusa (P) utrošeno je 9,9 ml iste otopine, tako da razlika iznosi (SP-P) 15 ml, što odgovara vrijednosti od 38,5 mg ukupnih reducirajućih šećera nakon hidrolize iz tablice 3.



$$\% \text{ ukup.red. šećera nakon hidrolize} = \frac{250 \times 100 \times 38,5 \text{ mg} \times 100}{10 \text{ g} \times 10 \text{ ml} \times 25 \times 1000} = 38,5 \%$$

$$\% \text{ prirodnog inverta} = \frac{250 \times 100 \times 9,7 \text{ mg} \times 100}{10 \text{ g} \times 25 \text{ ml} \times 25 \times 1000} = 3,88 \%$$

$$\% \text{ saharoze} = (\% \text{ ukupnog red.šećera} - \% \text{ reduciranih šećera}) \times 0,95 \quad [7]$$

### 3.2.1.6. Određivanje količine pepela

Količina pepela u korištenim sirovinama određuje se metodom koja je određena Pravilnikom o metodama fiz.-kem. analize za žita i mlinske proizvode 74/88 i HRN EN ISO 2171 : 2010 normom. Metoda za određivanje pepela modificirana je i rađena prema protokolu za određivanje prehrambenih vlakana - AACC 32 - 05.01 metode za određivanje ukupnih prehrambenih vlakana i AACC 32 - 21.01 metode za određivanje topljivih/netopljivih prehrambenih vlakana (Megazyme International Ireland, 2016).

#### Aparatura i pribor

1. posuda za spaljivanje, ravnog dna, od platine, kremenog pijeska (kvarca) ili porculana, promjera 50 mm do 55 mm i visine od 15 mm do 20 mm
2. eksikator sa silicagelom i indikatorom zasićenosti
3. ploča s električnim zagrijavanjem ili Bunsenov plamenik
4. analitička vaga, osjetljivosti +/- 0,0001 g , KERN ALS 220-4N (Balingen, Njemačka)
5. mufolna peć s regulatorom temperature i dovoljnim strujanjem zraka
6. termorezistentna ploča
7. laboratorijska kliješta

#### Postupak rada

Očišćene posude za spaljivanje se žare u mufolnoj peći oko 15 minuta na 900 °C do konstantne mase te se hlade u eksikatoru najmanje 1 h do sobne temperature i izvažu se.

Izvaže se 5 - 6 g samljevenog uzorka i ravnomjerno se rasporedi u izarene i izvagane posude za spaljivanje. Za postizanje ujednačenog izgaranja proizvoda, sadržaj u posudi se neposredno prije izlaganja može navlažiti sa 1 - 2 mL etanola. Posuda sa izvaganim uzorkom najprije se

zagrijava na početnom dijelu mufolne peći ili na električnoj ploči ili Bunsenovom plameniku. Kad se sadržaj u posudi ugljenizira, posuda se prenosi u mufolnu peć prethodno zagrijanu na 525 °C +/- 20 °C. Izgaranje se smatra završenim kad je ohlađeni uzorak bijele boje. Kad se izgaranje završi, posuda se hladi 1 minutu na termorezistentnoj ploči, a zatim u eksikatoru do sobne temperature. Nakon hlađenja, uzorak se brzo izvaže.

#### *Izračun količine pepela*

Količina pepela iskazuje se prema postocima mase prema suhoj tvari i izračunava prema formuli:

$$\text{količina pepela (\% m/m)} = m_1 \times \frac{100}{m_0} \times \frac{100}{100-v} \quad [8]$$

$m_0$  = masa ispitanog uzorka, u g

$m_1$  = masa ostatka, u g

$v$  = količina vode u ispitanom uzorku, u %

#### *3.2.1.7. Određivanje sadržaja raspoloživih ugljikohidrata*

Udio raspoloživih ugljikohidrata u ovom radu je određen računski, oduzimanjem mase vode, masti, proteina, pepela, reducirajućih šećera i vlakana od ispitivane količine namirnica (100 g). Iako reducirajući šećeri pripadaju raspoloživim ugljikohidratima, radi boljeg razumijevanja kemijskog sastava ispitivanih uzoraka, reducirajući šećeri su prikazani kao posebna kategorija.

### **3.2.2. Određivanje utjecaja tretmana ultrazvukom na sastav nezasićenih masnih kiselina heljde, prosa i bučine pogače**

#### *3.2.2.1. Priprema uzoraka*

##### Reagensi

1. destilirana voda
2. 96 %-tni etanol, Kefo (Sisak, Hrvatska)

##### Aparatura i pribor

1. mlin, FOSS, CT 193 Cyclotec™ (Hillerød, Danska)
2. laboratorijska vaga, KERN, ALS 220-4N (Balingen, Njemačka)
3. staklene čaše, 600 ml
4. ultrazvuk, Hielscher, UP400St (Teltow, Njemačka) sa sondom od titanija ( $d = 22 \text{ mm}$ )
5. magnetska miješalica, IKA® C-MAG HS 7 (Staufen im Breisgau, Njemačka)

6. termometar, IKA® ETS-D5 (Staufen im Breisgau, Njemačka)
7. laboratorijske boce
8. centrifuga, Hettich ZENTRIFUGEN, ROTINA 35 (Tuttlingen, Njemačka)
9. plastične epruvete za centrifugu
10. metalna žlica
11. Petrijeve zdjelice
12. sušionik, instrumentaria, ST-01/02 (Zagreb, Hrvatska)

### Postupak rada

Za određivanje udjela nezasićenih masnih kiselina koristi se sirovina (brašno) koja je usitnjena u mlinu. Uzorci za analizu (suspenzija) pripreme se na način da se izvaže 45 g brašna u staklenu čašu od 600 ml te se doda 300 ml 50 %-tne vodene otopine 96 %-tnog etanola (150 ml destilirane vode i 150 ml 96 %-tnog etanola). Kontrolni uzorci za sve tri sirovine se pripreme na način da se miješaju na magnetskoj miješalici podešenoj na  $MOT = 1,5$  na sobnoj temperaturi te na temperaturi od  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 20 minuta. Uzorci tretirani ultrazvukom pripreme se tako da se u suspenziju uroni ultrazvučna sonda od titanija promjera 22 mm, 24 kHz, snage 400 W pri amplitudi od 100 %, te je tretman trajao 5, 10 i 20 minuta. Nakon toga uzorak se prebaci u 6 plastičnih epruveta za centrifugu (masa čahure i uzorka 55 - 65 g) te se centrifugira 15 minuta na 10 000 okretaja. Nakon centrifugiranja talog se ravnomjerno rasporedi u Petrijeve zdjelice te se stavi na sušenje u sušionik na  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 1,5 h. Osušeni talog se koristi za ekstrakciju masti / odmašćivanje, kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.3 te nakon odmašćivanja za analizu sadržaja vlakana (poglavlje 3.2.3.)

#### *3.2.2.2. Priprema metilnih estera masnih kiselina*

### Reagensi

1. izooktan, J.T.Baker (Deventer, Nizozemska)
2. 2 M metanolna otopina KOH, Gram-Mol (Zagreb, Hrvatska)
3. Na-hidrogensulfat monohidrat, Acros Organics (New Jersey, SAD)

### Aparatura i pribor

1. staklene epruvete sa čepom
2. laboratorijska vaga, KERN ALS 220-4N (Balingen, Njemačka)
3. vortex, IKA® MS 3 basic (Staufen im Breisgau, Njemačka)
4. mikropipete (5 ml, 1 ml, 200  $\mu\text{l}$ ) i nastavci, Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
5. HPLC vijalice

### Postupak rada

Prethodno ekstrahirani uzorci masti koriste se za određivanje udjela nezasićenih masnih kiselina te ih je potrebno prevesti u oblik metilnih estera koji su hlapljivi, kako bi se mogla provesti analiza plinskom kromatografijom. Priprema metilnih estera radi se prema metodi HRN EN ISO 5009 : 2004.

U staklenu epruvetu izvaže se 60 mg uzorka masti te se doda 4 ml izooktana. Nakon toga doda se 200 µl 2 M metanolne otopine KOH te se vortexira 30 sekundi. U smjesu se doda 1 g Na-hidrogensulfat monohidrata i provortexira se. Bistra otopina gornjeg sloja (1 ml) se prebaci u HPLC vijalicu te se koristi za analizu na plinskom kromatografu.

#### *3.2.2.3. Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom*

##### Reagens

1. izooktan, J.T.Baker (Deventer, Nizozemska)

##### Aparatura i pribor

1. plinski kromatograf, ATI Unicam 610 (Cambridge, Engleska)
  - uvjeti rada:
    - kolona - kapilarna TR-FAME (Thermo), 30 m x 0,22 mm, debljina filma 0,25 µm; stacionarna faza – 70 % cijanopropil-polisilfenilen siloksan
    - temperatura kolone - programirana (120 °C do 160 °C – 4 °C min<sup>-1</sup>, 160 °C do 190 °C - 10 min<sup>-1</sup>, na 190 °C zadržava se 10 min)
    - plin nosioc - helij
    - protok plina nosioca - 0,7 ml min<sup>-1</sup>
    - temperatura injektora - 250 °C
    - split – 1 : 75
    - temperatura detektora – 280 °C
    - količina injektiranog uzorka- 1,0 µl
2. mikroinjektor, Hamilton Bonaduz, Microliter <sup>TM</sup> #701 (Bonaduz, Švicarska)
3. računalo s instaliranim 4880 softverom (Unicam 4880 Chromatography Dana System)

### Postupak rada

Analiza estera masnih kiselina vrši se prema metodi HRN EN ISO 5508 : 1999.

Za određivanje sastava masnih kiselina koristi se plinski kromatograf koji je opremljen sa injekcionim sustavom, pećnicom i plameno-ionizijskim detektorom (FID) koji je preko kanala

spojen na računalo. Uvjeti analize zadani su kompjuterskim sustavom nakon provedenih preliminarnih ispitivanja po kojima su odabrani optimalni uvjeti (temperatura kolone, detektora i injektora, količina injektiranog uzorka te protok plina).

Uzorci se unose u injektor pomoću mikroinjektora u količini od 1 µl. Kao bazna otopina koristi se izooktan. Za svaki pripremljeni uzorak rade se dvije paralelne probe te se kao rezultat uzima srednja vrijednost. Rezultati sastava masnih kiselina prikazani su grafički, kromatogramom (Prilog 1). Identifikacija pojedinih masnih kiselina provodi se usporedbom vremena zadržavanja metilnih estera standardne smjese 18 masnih kiselina (F.A.M.E.) poznatog sastava. Kvantitativni sastav masnih kiselina izračuna se prema metodi normalizacije površina koja je također kompjuterski odabrana.

### 3.2.3. Određivanje utjecaja tretmana ultrazvukom na udio netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana

Metoda određivanja netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana opisana je u poglavlju 3.2.1.4. Prije odmašćivanja uzorci tretirani ultrazvukom (trajanje tretmana 20 min pri 100 % amplitude) i netretirani uzorci pripreme se na način koji je opisan u poglavlju 3.2.2.1.

### 3.2.4. Obrada rezultata

Statistička obrada rezultata napravljena je u programu Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Izračun podataka u tablicama i grafovi su napravljeni u programu Excel 2016. Za izračun udjela netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana u koristio se Megazyme *Mega-Calc*<sup>TM</sup> (prilog 3) koji je preuzet s internetske stranice [www.megazyme.com](http://www.megazyme.com). Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom, a za usporedbu uzoraka korištena je analiza varijance (ANOVA), s Tukey post-hoc testom. Kao granica statističke značajnosti postavljena je vrijednost za  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu određivao se utjecaj tretmana mljevenog zrna heljde i prosa te bučine pogače ultrazvukom visokog intenziteta na udio nezasićenih masnih kiselina te udio njihovih topljivih i netopljivih vlakana. Tretman UVI (snage 400 W, 100 % amplitude) je proveden uranjanjem ultrazvučne sonde u trajanju 5, 10 ili 20 minuta u suspenziju pripremljenu iz 45 g brašna i 300 ml 48 %-tnog etanola. Ovdje je potrebno napomenuti da, iako je primjenjena snaga UVI bila 400 W to nije stvarna snaga prenesena na uzorak jer ona ovisi o koncentraciji, volumenu i specifičnoj toplini uzorka. Kod kontrolnog uzorka se, umjesto uranjanja ultrazvučne sonde, suspenzija miješala na magnetskoj miješalici bez grijanja i sa grijanjem na 55 °C u trajanju od 20 minuta. Nakon tretmana UVI, suspenzija je podvrgnuta centrifugiranju te se dobiveni talog nakon sušenja koristio za ekstrakciju masti metodom po Soxhletu. Ekstrahirana mast koristila se za pripremu metilnih estera masnih kiselina koji su se koristili za određivanje udjela nezasićenih masnih kiselina pomoću plinske kromatografije, dok je preostali kruti uzorak korišten za određivanje topljivih i netopljivih vlakana.

Ovo istraživanje je direktan nastavak na istraživanje provedeno i prikazano u diplomskom radu (Braje, 2017) u kojem je pod istim uvjetima i na istim uzorcima ispitivan utjecaj UVI na oslobađanje slobodnih fenolnih spojeva i antioksidanasa. Istraživanjem se želio dalje ispitati učinak UVI na pojedine komponente bučine pogače, heljde i prosa, kako bi se utvrdio smjer njegovog djelovanja (pozitivan, negativan ili neutralan).

Rezultati utjecaja tretmana ultrazvukom na udio nezasićenih masnih kiselina su prikazani u postocima ukupnih masnih kiselina, i to kao srednja vrijednost paralelnih uzoraka sa standardnom devijacijom.

Rezultati utjecaja tretmana ultrazvukom na udio netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana prikazani su na grafovima, i iskazani u postocima kao srednja vrijednost paralelnih uzoraka na suhu tvar odmašćenih uzoraka sa standardnom devijacijom.

Osim utjecaja UVI na sastav i udio nezasićenih masnih kiselina te topljivih i netopljivih vlakana, određen je i kemijski sastav bučine pogače, prosa i heljde. Rezultati su prikazani u postocima na suhu tvar sirovine u tablici za bučinu pogaču, dok su za proso i heljdu prikazani pomoću grafova. U tablici 4 su sumirano prikazane korištene metode za određivanje udjela pojedinih sastojaka navedenih sirovina.

**Tablica 4.** Prikaz metoda za određivanje pojedinih sastojaka ispitivanih namirnica

Ispitivani sastojci	Metoda određivanja
voda/suha tvar	sušenje (gravimetrijska metoda)
proteini	metoda po Kjeldahl-u
masti	metoda po Soxhletu
ugljikohidrati	podaci dobiveni razlikom ostalih sastojaka
vlakna	enzimsko-gravimetrijska metoda
ukupni reducirajući šećeri	volumetrijska metoda po Luff-Schoorl-u
pepeo	spaljivanje (gravimetrijska metoda)

#### 4.1. KEMIJSKI SASTAV HELJDE, PROSA I BUČINE POGAČE

U ovome radu određen je kemijski sastav ispitivanih sirovina te su rezultati prikazani u daljnjim tablicama i slikama. Kemijski sastav je određen s ciljem utvrđivanja potencijalnog korištenja heljde, prosa i bučine pogače u proizvodnji funkcionalnih proizvoda. Iako literaturni podaci o kemijskom sastavu prosa i heljde postoje, podaci o hranjivom sastavu bučine pogače su rijetki. Stoga smo željeli istim metodama i u istim laboratorijskim uvjetima analizirati sve tri sirovine kako bi mogli bučinu pogaču preciznije pozicionirati u odnosu na ove žitarice. Rezultati su izraženi na suhu tvar uzorka (tablica 6; slike 10 i 11), a udio vode, odnosno suhe tvari prikazan je u tablici 5.

**Tablica 5.** Udio suhe tvari i vode (%)

Sirovina	Suha tvar	Voda
Heljda	$87,3 \pm 0,11$	$12,7 \pm 0,11$
Proso	$87,25 \pm 0,11$	$12,75 \pm 0,11$
Bučina pogača	$98,55 \pm 0,06$	$1,45 \pm 0,06$

Kemijski sastav bučine pogače prikazan je u tablici 6. Rezultati su pokazali da bučina pogača u svom sastavu sadrži visoki udio proteina, preko 50 %. Udio ukupnih vlakana iznosi  $16,58 \pm 0,49$  % te ona čine većinu ukupnih ugljikohidrata (od čega  $3,48 \pm 0,40$  % čine topljiva, a  $13,1 \pm 0,14$  % netopljiva, tablica 6), dok ostali dio čine reducirajući šećeri ( $1,93 \pm 0,02$  %). Osim

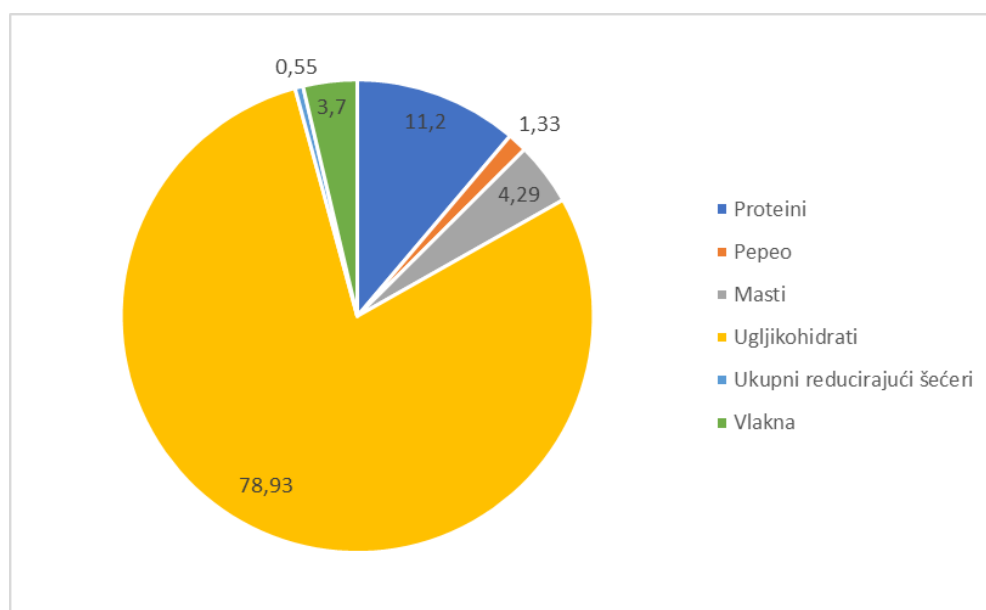
reducirajućih šećera, drugi raspoloživi ugljikohidrati u ovome radu nisu detektirani. Iako se bučina pogača dobiva prilikom proizvodnje bučinog ulja, čak  $22,15 \pm 0,03$  % njezine suhe tvari čini ulje koje je zaostalo u tom procesu. Iz tablice 9 se vidi da visok udio masnih kiselina ulja u bučinoj pogači čine nezasićene masne kiseline - oleinska i linolna.

**Tablica 6.** Kemijski sastav bučine pogače (% na suhu tvar)

Sirovina	Proteini	Pepeo	Masti	Ugljikohidrati*	Ukupni reducirajući šećeri	Vlakna		
						ukupna	topljiva	netopljiva
Bučina pogača	$50,9 \pm 0,04$	$9,65 \pm 0,01$	$22,15 \pm 0,03$	nd	$1,93 \pm 0,02$	$16,58 \pm 0,49$	$3,48 \pm 0,40$	$13,1 \pm 0,14$

\*Ugljikohidrati bez reducirajućih šećera i vlakana  
nd – nije detektirano

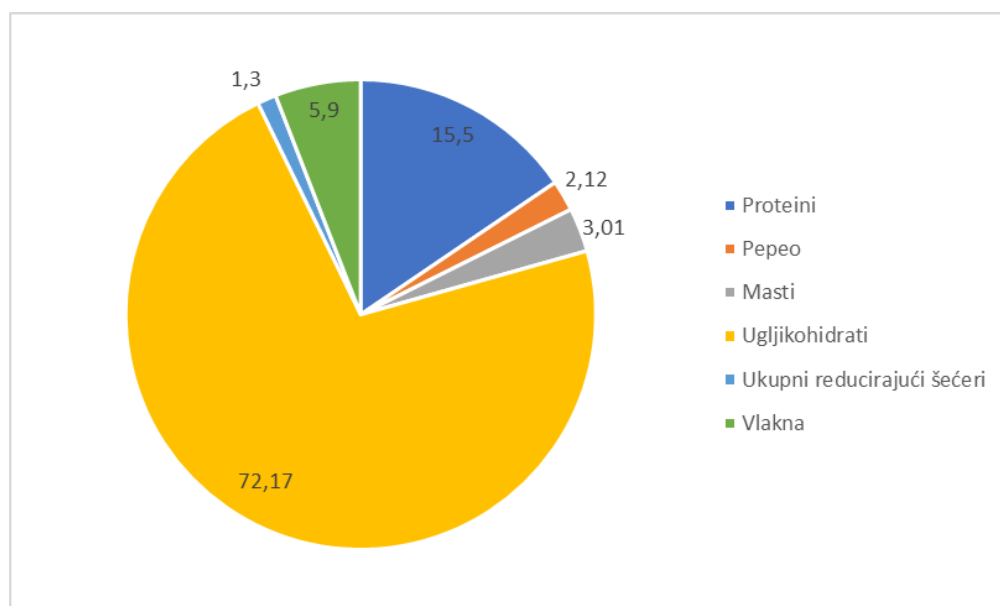
U radu Tarek-Tilistyák i sur. (2014) također je određen kemijski sastav bučine pogače te je zabilježen sličan udio proteina (50,4 %). Većinu ukupnih ugljikohidrata isto su činila vlakna koja su zabilježena u nešto većem udjelu (23,2 %) u odnosu na udio dobivenih u ovome radu, dok je udio ulja znatno manji i iznosi 8,2 %. U istom radu bučina pogača je korištena za obogaćivanje kruha. Kemijski sastav određen ovim istraživanjem također ide u prilog bučinoj pogači kao sirovini koja bi se mogla koristiti za obogaćivanje prehrambenih proizvoda, posebice proteinima i vlaknima.



**Slika 10.** Kemijski sastav prosa (% na suhu tvar)



Kemijski sastav prosa prikazan je na slici 10. Najveći udio svih sastojaka prosa čine ugljikohidrati, 78,93 % suhe tvari (u udio ne ulaze reducirajući šećeri i vlakna). Udio proteina iznosi  $11,2 \pm 0,43$  %, dok je udio masti  $4,29 \pm 0,01$  %. Udio vlakana iznosi  $3,7 \pm 0,08$  %, ali treba napomenuti da je određen kemijski sastav oljuštenog prosa. Sastav prosa koji je dobiven u drugim istraživanjima varira, pa tako udio ugljikohidrata iznosi 60 – 75 %, proteina 5 – 13 %, masti 1,5 – 5 %, a vlakana 2 - 8,5 % (Devi i sur., 2014; Thilagavathi i sur., 2015; Sarita i Ekta Singh, 2016) što je u skladu sa vrijednostima dobivenim ovim istraživanjem.



**Slika 11.** Kemijski sastav heljde (% na suhu tvar)

Kemijski sastav heljde prikazan je na slici 11. Najveći udio među sastojcima heljde čine ugljikohidrati (u udio ne ulaze reducirajući šećeri i vlakna) koji su zastupljeni u udjelu od 72,17 %. Nakon ugljikohidrata, prema zastupljenosti su najviše prisutni proteini kojih ima  $15,5 \pm 0,43$  % te vlakna ( $5,9 \pm 0,08$  %). Udio masti je nizak i iznosi  $3,01 \pm 0,01$  %. Prema podacima iz rada Christa i Soral-Šmietana (2008) udio škroba iznosi 59 – 70 % na suhu tvar, proteina 12 - 18,9 %, vlakana 7 % te udio masti iznosi 1,5 – 4 %. Ti podaci mogu se povezati sa rezultatima dobivenim ovim istraživanjem.

Kemijski sastav prosa i heljde su slični. Obje sirovine u svome sastavu sadrže najviše raspoloživih ugljikohidrata. Heljda za razliku od prosa sadrži veći udio proteina (4,3 % više) i vlakana (2,2 % više) te manji udio masti (1,28 % manje). Dodatno, nutritivna prednost heljde pred prosom očituje se i u količinama fenolnih spojeva i antioksidanasa, kao što je prethodno dokazano (Braje, 2017). Bučina pogača razlikuje se sastavom od heljde i prosa te ima znatno veći udio proteina, vlakana i masti od ispitivane žitarice i pseudožitarice. Također je udio pepela veći u bučinoj pogači ( $9,65 \pm 0,01$  %) za razliku od heljde ( $2,12 \pm 0,01$  %) i prosa ( $1,33 \pm 0,01$  %).

#### 4.2. UTJECAJ TRETMANA ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA NA UDIO NEZASIĆENIH MASNIH KISELINA HELJDE, PROSA I BUČINE POGAČE

Utjecaj tretmana UVI određen je na temelju sastava i udjela nezasićenih masnih kiselina u uzorcima brašna heljde, prosa i bučine pogače. Većina istraživanja koja su do sada proučavala vezu između ultrazvuka i masnih kiselina fokusirala su se na utjecaj ultrazvuka na ekstrakciju ulja (masnih kiselina) (Tian i sur., 2013; Da Porto i sur., 2013; Gutte i sur., 2015). Iako postoji i manji broj istraživanja u kojima je istražen utjecaj tretmana ultrazvukom na masne kiseline (Chemat i sur., 2004; Luque-García i Luque de Castro, 2004; Pingret i sur., 2012; Al Juhaimi i sur., 2017) utjecaj ultrazvuka na heljdu, proso i bučinu pogaču još do sada nije bio ispitan.

U sljedećim tablicama je prikazan utjecaj tretmana UVI na sastav i količinu nezasićenih masnih kiselina (NMK) u uzorcima brašna heljde, prosa i bučine pogače.

**Tablica 7.** Udio nezasićenih masnih kiselina (%) u uzorcima heljde sa i bez tretmana UVI

Nezasićene masne kiseline	Nula	Nula + grijanje	5 min	10 min	20 min
Palmitoleinska C 16:1	$0,23 \pm 0,04^a$	$0,19 \pm 0,01^a$	$0,24 \pm 0,08^a$	$0,24 \pm 0,06^a$	$0,20 \pm 0,01^a$
Oleinska C 18:1	$36,65 \pm 0,62^a$	$37,18 \pm 0,29^a$	$37,47 \pm 0,08^a$	$37,15 \pm 0,14^a$	$36,58 \pm 0,21^a$
Linolna C 18:2	$36,90 \pm 0,51^a$	$36,79 \pm 0,20^a$	$36,62 \pm 0,11^a$	$36,88 \pm 0,27^a$	$37,23 \pm 0,07^a$
Linolenska C 18:3	$2,14 \pm 0,08^{ab}$	$2,11 \pm 0,02^{abc}$	$2,01 \pm 0,04^c$	$2,05 \pm 0,01^{bc}$	$2,20 \pm 0,05^a$

Gadoleinska C 20:1	$3,11 \pm 0,28^a$	$3,15 \pm 0,09^a$	$3,03 \pm 0,15^a$	$3,05 \pm 0,15^a$	$3,28 \pm 0,04^a$
Eruka C 22:1	$0,16 \pm 0,03^a$	$0,13 \pm 0,02^a$	$0,14 \pm 0,01^a$	$0,13 \pm 0,02^a$	$0,17 \pm 0,04^a$

Nula - suspenzija je miješana na magnetskoj miješalici na sobnoj temp. u trajanju od 20 minuta

Nula + grijanje - suspenzija je miješana na magnetskoj miješalici uz grijanje na 55 °C u trajanju od 20 min

5, 10 i 20 min - tretman ultrazvukom (uranjanje sonde u suspenziju) u različitom vremenu trajanja pri 100 % amplitude

Različitim slovima označeni su uzorci unutar jednog reda između kojih postoji statistički značajna razlika,  $p \leq 0,05$

Najzastupljenije nezasićene masne kiseline u heljdi su linolna (36,90 %) i oleinska (36,65 %) te su one zastupljene u gotovo istim udjelima (tablica 7). Podaci su u skladu s istraživanjem Ahmed i sur. (2014) gdje su također određeni gotovo jednaki udjeli tih dviju masnih kiselina. Među ispitivanim sirovinama heljda je jedina u kojoj je zabilježena prisutnost eruka masne kiseline, iako je udjelno gotovo zanemariva (0,16 %). Utjecaj tretmana UVI na sastav NMK heljde prikazan je u tablici 7. Rezultati pokazuju da grijanje uzorka na 55 °C u trajanju od 20 min bez tretmana UVI u nekim slučajevima pokazuje povećanje (najveće povećanje pokazuje oleinska kiselina sa 36,65 % na 36,97 %), a u drugim smanjenje udjela NMK u odnosu na nezagrijani i netretirani uzorak (najveće smanjenje pokazuje linolna kiselina sa 36,90 % na 36,79 %), ali razlika nikada nije statistički značajna. Povećanje udjela masnih kiselina nakon tretmana ultrazvukom vidljivo je za linolnu, linolensku, eruka i gadoleinsku kod tretmana ultrazvukom u trajanju od 20 min, dok je tretman od 5 i 10 min utjecao na smanjenje udjela navedenih masnih kiselina u usporedbi sa nezagrijanim, netretiranim uzorkom. Vrijednosti za linolnu, gadoleinsku i eruka masnu kiselinu u tretiranim uzorcima nisu statistički značajne, dok su rezultati za linolensku masnu kiselinu statistički značajni ( $p \leq 0,05$ ), ali samo za tretman ultrazvukom u trajanju od 5 min (2,01 %) u usporedbi sa netretiranim kontrolnim uzorkom (2,14 %). Također, između uzoraka heljde tretiranom UVI u trajanju od 20 min (2,20 %) i uzorcima tretmanima 5 i 10 min (2,01 % i 2,05 %) postoji statistički značajna razlika u količini omega-3 linolenske masne kiseline. Suprotno tome, tretman ultrazvukom u trajanju od 5 i 10 min utjecao je na povećanje udjela palmitoleinske i oleinske masne kiseline, dok je tretman u trajanju od 20 min utjecao na smanjenje udjela navedenih kiselina, ali rezultati nisu statistički značajni ( $p > 0,05$ ).

**Tablica 8.** Udio nezasićenih masnih kiselina (%) u uzorcima prosa sa i bez tretmana UVI

Nezasićene masne kiseline	Nula	Nula + grijanje	5 min	10 min	20 min
Palmitoleinska C 16:1	0,15 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>a</sup>
Oleinska C 18:1	21,41 ± 0,69 <sup>a</sup>	21,35 ± 1,81 <sup>a</sup>	20,82 ± 0,32 <sup>a</sup>	22,21 ± 0,07 <sup>a</sup>	20,83 ± 0,69 <sup>a</sup>
Linolna C 18:2	63,56 ± 0,89 <sup>ab</sup>	64,06 ± 1,41 <sup>ab</sup>	64,35 ± 0,01 <sup>ab</sup>	61,92 ± 0,02 <sup>a</sup>	64,67 ± 0,93 <sup>b</sup>
Linolenska C 18:3	0,97 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,08 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,06 <sup>a</sup>
Gadoleinska C 20:1	0,51 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,17 <sup>a</sup>

Nula - suspenzija je miješana na magnetskoj miješalici na sobnoj temp. u trajanju od 20 minuta

Nula + grijanje - suspenzija je miješana na magnetskoj miješalici uz grijanje na 55 °C u trajanju od 20 min

5, 10 i 20 min - tretman ultrazvukom (uranjanje sonde u suspenziju) u različitom vremenu trajanja pri 100 % amplitude

Različitim slovima označeni su uzorci unutar jednog reda između kojih postoji statistički značajna razlika,  $p \leq 0.05$

Najveći udio NMK u prosu čini linolna (63,56 %), a nakon nje slijedi oleinska (21,41 %) (tablica 8). Rezultat utjecaja tretmana UVI na NMK u sastavu prosa prikazan je u tablici 8. Utjecaj grijanja uzorka na 55 °C u trajanju od 20 min bez tretmana UVI nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na njihov udio u netretiranom i nezagrijanom uzorku. Na sastav svih masnih kiselina u uzorcima prosa tretman UVI u trajanju od 10 min djelovao je suprotno u usporedbi sa tretmanom koji je trajao 5 i 20 min. Kod palmitoleinske, linolne i linolenske masne kiseline tretman UVI u trajanju od 10 min izazvao je malo smanjenje njihovog udjela u odnosu na netretirani i nezagrijani uzorak, dok je tretman od 5 i 20 min utjecao na njihovo povećanje. Statistički značajna razlika zabilježena je samo za linolnu kiselinu i to uspoređujući tretmane od 10 min (61,92 %) i 20 min (64,67 %). Kod ostalih NMK (oleinske i gadoleinske) učinak je bio suprotan pa je tretman od 10 min uzrokovao povećanje, a tretman od 5 i 20 min smanjenje njihovog udjela, bez statistički značajne razlike.

**Tablica 9.** Udio nezasićenih masnih kiselina (%) u uzorcima bučine pogače sa i bez tretmana UVI

Nezasićene masne kiseline	Nula	Nula + grijanje	5 min	10 min	20 min
Palmitoleinska C 16:1	0,13 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>a</sup>
Oleinska C 18:1	35,78 ± 0,03 <sup>a</sup>	35,79 ± 0,05 <sup>a</sup>	35,99 ± 0,04 <sup>a</sup>	35,98 ± 0,15 <sup>a</sup>	35,89 ± 0,19 <sup>a</sup>
Linolna C 18:2	46,06 ± 0,02 <sup>ab</sup>	45,83 ± 0,04 <sup>a</sup>	46,15 ± 0,05 <sup>b</sup>	46,07 ± 0,18 <sup>ab</sup>	45,91 ± 0,08 <sup>a</sup>
Linolenska C 18:3	0,27 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>a</sup>
Gadoleinska C 20:1	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>

Nula - suspenzija je miješana na magnetskoj miješalici na sobnoj temp. u trajanju od 20 minuta

Nula + grijanje- suspenzija je miješana na magnetskoj miješalici uz grijanje na 55 °C u trajanju od 20 min

5, 10 i 20 min- tretman ultrazvukom (uranjanje sonde u suspenziju) u različitom vremenu trajanja pri 100 % amplitude

Različitim slovima označeni su uzorci unutar jednog reda između kojih postoji statistički značajna razlika,  $p \leq 0.05$

Najveći udio NMK u sastavu bučine pogače čini linolna (46,06 %) te iza nje slijedi oleinska (35,78 %) masna kiselina (tablica 9). Sličan udio je zabilježen u radu Delaš (2010) gdje prema podacima udio linolne iznosi 46,58 %, dok udio oleinske masne kiseline iznosi 35,12 %. Rezultat utjecaja tretmana UVI na udio NMK bučine pogače prikazan je u tablici 9. Udio NMK u netretiranom i nezagrijanom uzorku bučine pogače u odnosu na uzorak koji je grijan na 55 °C u trajanju od 20 min bez tretmana UVI nije pokazao statistički značajnu razliku na udio nijedne masne kiseline. Statistički značajna razlika utjecaja zabilježena je jedino za linolnu masnu kiselinu i to između tretmana UVI u trajanju od 5 min (46,15 %) te grijanog uzorka na 55 °C u trajanju od 20 min (45,83 %) i tretmana UVI u trajanju od 20 min (45,91 %). Udio NMK u uzorcima bučine pogače pokazao je najmanje razlike uspoređujući tretman UVI u trajanju od 5, 10 i 20 min sa uzorcima brašna heljde i prosa. Najveća razlika koja je ujedno i statistički značajna je između trajanja tretmana UVI od 5 i 20 min te iznosi 0,24 %, dok je kod ostalih vrijednosti razlika manja ili jednaka 0,01 % ili nije zabilježena.

Nedostatak promjena ili minimalne detektirane promjene u udjelima i količinama nezasićenih masnih kiselina u skladu su s prijašnjim istraživanjima. Tako je istraživanje Luque-García i

Luque de Castro (2004) pokazalo da nakon tretmana ultrazvukom nije došlo do promjene udjela masnih kiselina u sjemenkama suncokreta, soje i uljane repice. Al Juhaimi i sur. (2017) su pak u svom radu zabilježili različite utjecaje tretmana ultrazvukom u trajanju od 10, 20 i 30 min na sastav masnih kiselina lješnjaka, kikirikija i crnog kima. Najveći utjecaj na smanjenju udjela oleinske kiseline u uzorcima lješnjaka i kikirikija te linolne kiseline u uzorku crnog kima uzrokovao je tretman u trajanju od 30 min. Chemat i sur. (2004) te Pingter i sur. (2012) ispitivali su utjecaj ultrazvuka na suncokretovo ulje, s naglaskom na temperaturu tretmana te materijal korištene ultrazvučne sonde. Prvi su pokazali da je tretman ultrazvukom u trajanju 1 h pri temperaturama 20 °C i 60 °C blago snizio udio linolne kiseline, dok je oleinska bila blago snižena pri 20 °C, a povišena pri 60 °C u odnosu na netretirani uzorak. Pingret i sur. (2012) su pak ulje suncokreta tretirali 15 min na temperaturi 25 °C te su koristili ultrazvučne sonde od dva različita materijala i veličine te pri dva uvjeta: (I) sonda od titanija, vrh sonde 6 mm, 20 kHz, maksimalne snage 140 W te (II) sonda od Pyrex®a, vrh sonde 17 mm, 24 kHz, maksimalne snage 180 W. U tom radu je također došlo do vrlo malih ili nikakvih promjena u sastavu i udjelu masnih kiselina, no autori su također promatrali i druge parametre degradacije lipida (peroksidni broj, slobodne masne kiseline, anisidinski broj, oksidacijsku vrijednost (TOTOX), konjugirane diene, polarne spojeve) te utvrdili da kod većine njih dolazi do porasta, bilo blagog, bilo značajnog (u slučaju peroksidnog broja, anisidinskog broja, TOTOX-a i slobodnih masnih kiselina), pri čemu su vrsta korištene sonde i uvjeti tretmana značajno utjecali na konačne rezultate. Sonda od titanija je inducirala manju pojavu slobodnih radikala te se kao takva pokazala prikladnija za ultrazvučni tretman lipida.

Općenito, kako je istaknuto u radu Pingret i sur. (2013) još nije razjašnjen način na koji ultrazvuk utječe na degradaciju lipida. Do degradacije lipida dolazi zbog reakcija hidrolize ili oksidacije, do kojih pak može doći zbog autooksidacije, foto-oksidacije ili enzimske oksidacije, te ovisi o mnogo čimbenika poput fotosenzibilizacije, sastava masnih kiselina, vrste kisika, kao i prisustva manjih spojeva poput metala, pigmenata, fosfolipida, slobodnih masnih kiselina, mono i diacilglicerola, oksidansa te antioksidanasa. Degradacija lipida nije samo problem zbog smanjenja senzorske prihvatljivosti nego i zbog zdravstvene sigurnosti, budući da može doći do stvaranja molekula koje se mogu vezati za intrastanične nukleofile, što posljedično rezultira denaturacijom proteina i DNA te mogućnostima pojave mutacija. Zbog svega navedenog potrebno je istražiti moguće mehanizme i čimbenike koji utječu na oksidaciju za bolje razumijevanje učinka ultrazvuka na lipide. Među čimbenike koji su prisutni u ultrazvučnoj preradi hrane ubrajaju se mnogi koji utječu na degradaciju lipida: izvor energije, sastav masnih kiselina, vrsta kisika i manjih sastojaka poput metala, pigmenata, fosfolipida, slobodnih masnih

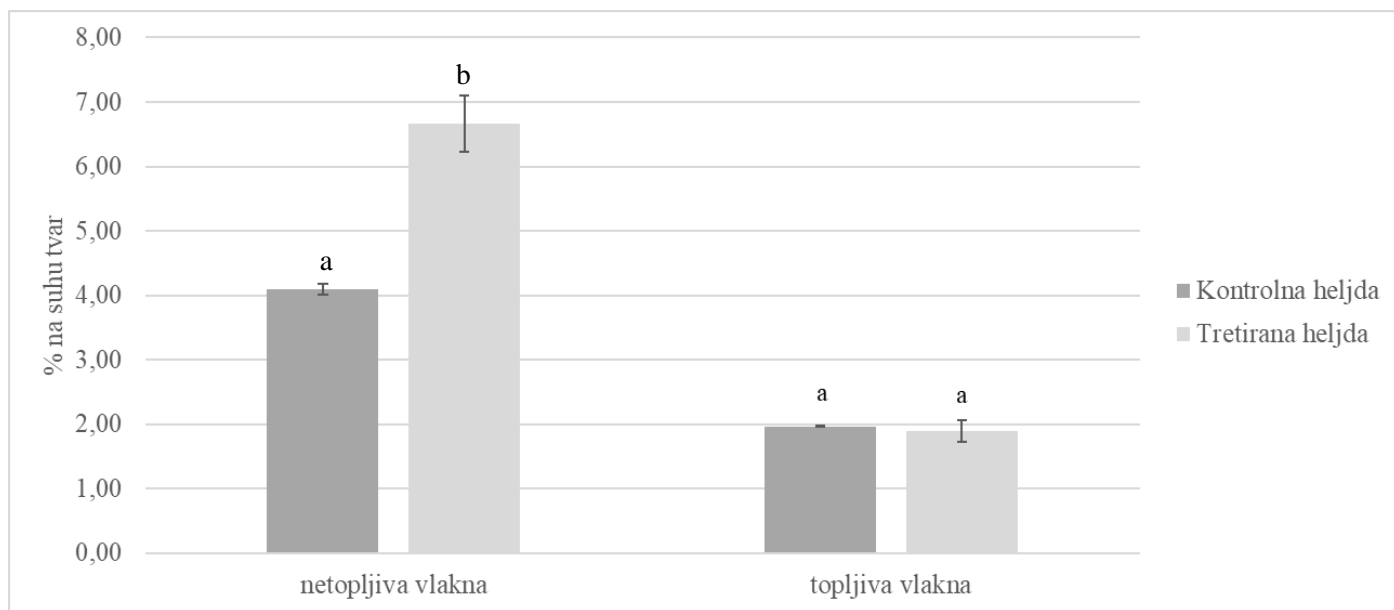
kiselina, mono i diacilglicerola, termički oksidiranih spojeva i antioksidanasa. U ovom istraživanju mjerenje udjela nezasićenih masnih kiselina odabrana je kao jedna od metoda kojom se može kvantificirati oksidacija (zasićene masne kiseline nisu pri tome dobar parametar jer praktički ostaju nepromijenjene tijekom auto-oksidacije). Međutim, kako je vidljivo, mogu se koristiti i druge metode poput testova za određivanje konjugiranih diena, peroksidnog broja, kiselinskog broja te analiza hlapljivih molekula, iako se navodi da se hlapljive molekule najprije degradiraju djelovanjem ultrazvuka. Oksidativna stabilnost se ne smatra standardnim parametrom kvalitete ulja, iako može biti korisna za procjenu roka trajanja (Pingret i sur., 2013). Dodatno, dobra procjena degradacije lipida može biti i senzorska analiza (Pingret i sur., 2012).

#### **4.3. UTJECAJ TRETMANA ULTRAZVUKOM VISOKOG INTENZITETA NA UDIO NETOPLJIVIH I TOPLJIVIH PREHRAMBENIH VLAKANA HELJDE, PROSA I BUČINE POGAČE**

Poznato je da se fizikalno-kemijska svojstva vlakana mogu modificirati kemijskim, enzimskim, mehaničkim (npr. mljevenje), termalnim ili termo-mehaničkim (npr. ekstruzija) tretmanima, čime se mijenja njihova funkcionalnost. Tako se zna da mljevenje mijenja hidratacijska svojstva vlakana, dok grijanje općenito mijenja omjere topljivih i netopljivih vlakana (Dhingra i sur., 2012). Osim toga, termalno procesiranje može povećati sadržaj vlakana, kao što je pokazano u radu Dziedzic i sur. (2012) u kojem je tostirano zrno heljde imalo veći sadržaj netopljivih i topljivih vlakana u odnosu na netretirano. Također je takav učinak uočen i u radu Heś i sur. (2014) gdje je zrno heljde nakon vrenja u vodi imalo veći sadržaj topljivih i netopljivih vlakana u usporedbi sa netretiranim.

Međutim, u preglednom radu Dhingra i sur. (2012), uočeno je da je većina istraživanja koja se bavila utjecajem procesiranja na vlakna starijeg datuma, odnosno 20-ak i više godina staro, dok se dodatnim pregledom literature pokazalo da utjecaj tretmana UVI na udio prehrambenih vlakana nije do sada istraživan, posebice ne u materijalima poput žitarica i uljarica.

Sljedeće slike grafički prikazuju udio netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana u odmašćenim kontrolnim (netretiranim) i tretiranim uzorcima brašna heljde, prosa i bučine pogače.



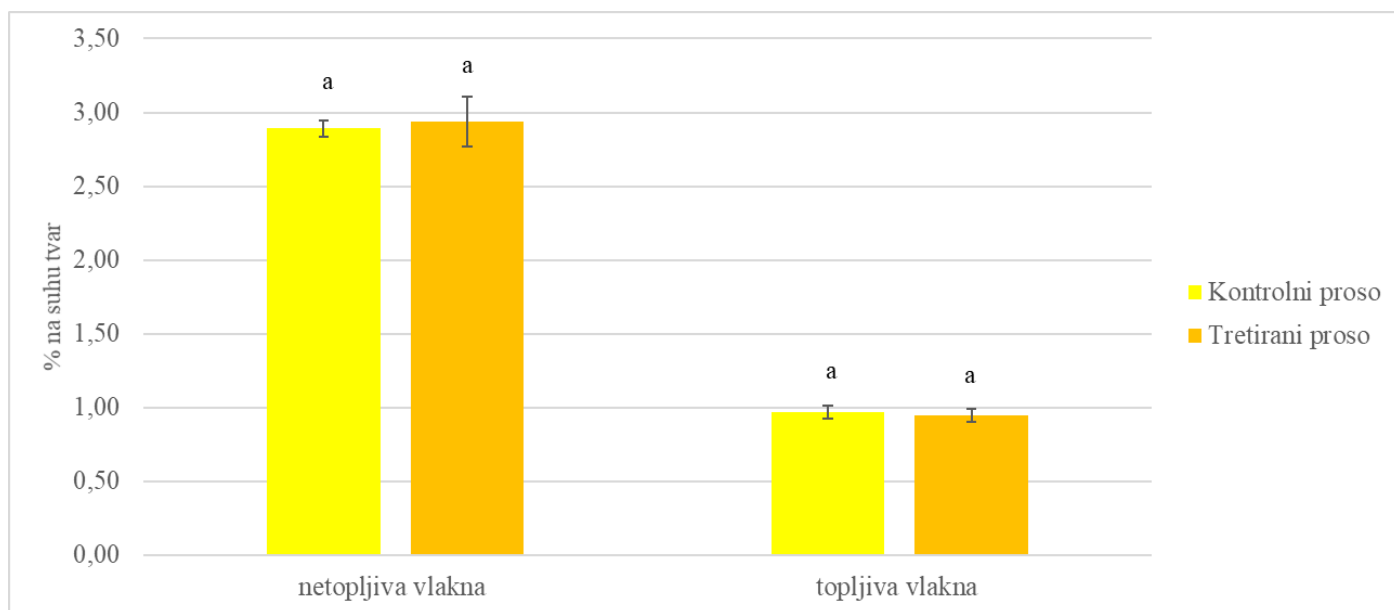
**Slika 12.** Udio netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana u kontrolnim i UVI tretiranim uzorcima odmašćene heljde

Udio netopljivih vlakana u tretiranom uzorku heljde se povećao na  $6,66 \pm 0,43$  % u odnosu na njihov udio u kontrolnom uzorku ( $4,10 \pm 0,08$  %) što je vidljivo na slici 12, a razlika do koje je došlo statistički je značajna ( $p \leq 0,05$ ). Udio topljivih vlakana u oba uzorka je ostao isti. Od ukupnih vlakana, netopljiva vlakna u heljdi zauzimala su  $67,54 \pm 0,08$  %, dok su topljiva zauzimala  $32,46 \pm 0,08$  %.

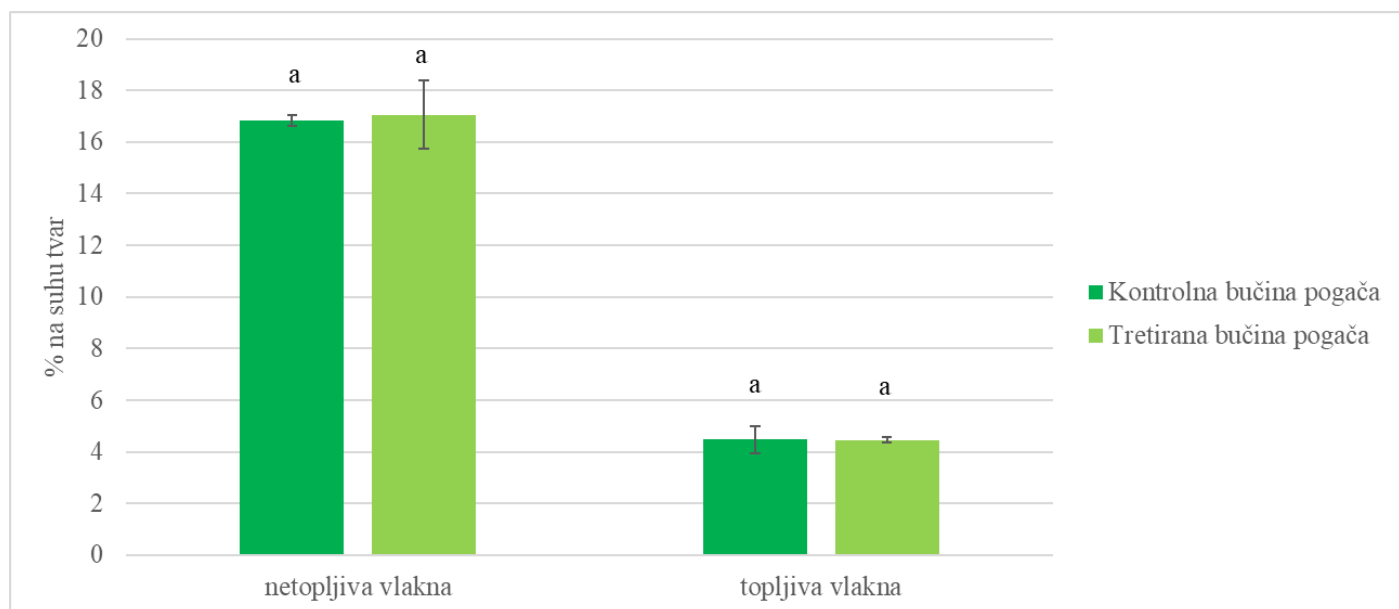
Veze između polifenolnih spojeva i prehrambenih vlakana u biljnoj hrani igraju važnu ulogu u kontroli oslobađanja biokativnih komponenti (González-Aguilar i sur., 2017). Oko 95 % fenolnih komponenti u žitaricama je kovalentno povezano sa polisaharidima stanične stijenke esterskom vezom (Vitaglione i sur., 2008). Ipak, u istraživanju Hung i Morita (2008) se navodi da su fenolne komponente u heljdi uglavnom prisutne u slobodnom obliku u odnosu na druge žitarice. Budući da se u netopljiva prehrambena vlakna svrstavaju sastojci stanične stijenke (celuloza, lignin, hemiceluloza) (Dhingra i sur. 2012; Dai i Chau, 2017), moguće je da je uslijed tretmana UVI došlo do pucanja stanične stijenke te su se oslobodila navedena vlakna (za koje se pretpostavlja da su također prisutna u slobodnom obliku), što je u konačnici dovelo do povećanja njihovog udjela, odnosno da je možda došlo do reorganizacije strukture i povezivanja kompleksa vlakana i proteina (Dhingra i sur. 2012). Povećanje udjela polifenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta u uzorcima heljde tretiranim UVI se pripisuje njihovoj većoj



prisutnosti u slobodnom obliku i utjecaju ultrazvuka visokog intenziteta na povećanje njihovog oslobađanja (Braje, 2017).



**Slika 13.** Udio netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana u kontrolnim i UVI tretiranim uzorcima odmašćenog prosa



**Slika 14.** Udio netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana u kontrolnim i UVI tretiranim uzorcima odmašćene bučine pogače

Tretman UVI nije pokazao učinak na udio netopljivih kao niti topljivih prehrambenih vlakana u uzorcima prosa i bučine pogače što je vidljivo na slikama 13 i 14, odnosno nije došlo do statistički značajnog povećanja netopljivih vlakana u bučinoj pogači gdje se količina povećala sa  $16,83 \pm 0,22$  % u kontrolnom uzorku na  $17,06 \pm 1,31$  % u tretiranom uzorku, dok se u prosu povećala sa  $2,89 \pm 0,05$  % na  $2,94 \pm 0,17$  % (izraženo na suhu tvar). Udio netopljivih vlakana bučine pogače iznosi  $79,01 \pm 0,49$  %, a prosa  $76,17 \pm 0,03$  % ukupnih vlakana. Utjecaj UVI na topljiva vlakna, koja su u bučinoj pogači činila  $20,99 \pm 0,49$  %, a u prosu  $23,83 \pm 0,03$  % ukupnih vlakana, također nije statistički značajan.

Iako je u ovom istraživanju pokazano da, s izuzetkom heljde, UVI nema utjecaj na sadržaj, omjere i količinu topljivih i netopljivih vlakana, mogućnost djelovanja ultrazvuka na vlakna još uvijek ne treba odbaciti. Naime, moguće je da korištena enzimsko-gravimetrijska metoda nije dovoljno robusna, te ne uključuje i analizu topljivih vlakna male molekulske mase (oligosaharida). Usprkos tome, istraživanje Zhang i sur. (2013), koje je proučavalo utjecaj ultrazvuka na strukturu i reološka svojstva pektina jabuke, je utvrdilo da ultrazvuk nije imao utjecaj na primarnu strukturu pektina, ali je značajno utjecao na viskozna svojstva. Stoga bi u budućnosti trebalo razmisliti da se umjesto gravimetrijske metode, kao pokazatelja utjecaja na svojstva vlakna koristi neka od fizikalnih odnosno reoloških metoda. Osim toga, kao što je pokazano u radu Hromádková i sur. (2003), ultrazvuk može biti korišten kao metoda za ubrzanje procesa ekstrakcije vlakana. Dodatno, to isto istraživanje je pokazalo da ultrazvučni tretman nema značajnih utjecaja na strukturna i molekularna svojstva hemiceluloze ekstrahirane iz ljuskica heljde.

## 5. ZAKLJUČCI

Prema rezultatima ovog istraživanja izvedeni su slijedeći zaključci:

1. U usporedbi sa kemijskim sastavom prosa i heljde, bučina pogača se pokazala kao najbogatiji izvor proteina, masti, prehrambenih vlakana te pepela (mineralnih tvari), no i najsiriromašniji izvor raspoloživih ugljikohidrata.
2. Visoki sadržaj proteina (51 %), ulja (22 %) i vlakana (17 %), koja čine gotovo ukupni udio svih ugljikohidrata, ukazuje na visoki potencijal bučine pogače u obogaćivanju prehrambenih proizvoda.
3. U nativnim uzorcima heljde, prosa i bučine pogače najveći udio nezasićenih masnih kiselina zauzima esencijalna omega-6 linolna masna kiselina te njezin udio iznosi 37 % ukupnih masnih kiselina heljde, 64 % prosa i 46 % bučine pogače. Najveći udio esencijalne omega-3 linolenske masne kiseline prisutan je u heljdi, gdje zauzima 2 % ukupnih masnih kiselina.
4. Zagrijavanje uzoraka (55 °C) u trajanju od 20 min nije pokazalo statistički značajan utjecaj na udio nezasićenih masnih kiselina u uzorcima heljde, prosa i bučine pogače.
5. Ultrazvuk visokog intenziteta (UVI) u trajanju 5, 10 i 20 min pri 100 % amplitude nije pokazao učinak na udio nezasićenih masnih kiselina ispitivanih uzoraka. Statistički značajno smanjenje ( $p \leq 0,05$ ) u odnosu na netretirani uzorak postignuto je samo za omega-3 linolensku masnu kiselinu u heljdi i to u usporedbi sa tretmanom UVI u trajanju od 5 min.
6. U bučinoj pogači, heljdi i prosu većinu ukupnih vlakana čine netopljiva vlakna, i to 79 % za bučinu pogaču, 68 % za heljdu i 76 % za proso.
7. Tretman UVI u trajanju od 20 minuta pri 100 % amplitude utječe samo na povećanje netopljivih vlakana heljde.
8. Tretman UVI u trajanju od 20 minuta pri 100 % amplitude ne utječe na količinu topljivih vlakana heljde, prosa i bučine pogače.

## 6. LITERATURA

AACC International Method 44-15.02, Moisture-Air-Oven Method

AACC Method 46-12, 9th Ed., Vol.2. Crude Protein-Kjeldahl Metoda, Boric Acid Modification

Ahmed, A., Khalid, N., Ahmad, A., Abbasi, N. A., Latif, M. S. Z., Randhawa, M. A. (2014) Phytochemicals and biofunctional properties of buckwheat: a review. *J. Agric. Sci.* **152**, 349-369.

Al Juhaimi, F., Uslu, N., Özcan, M. M. (2017) The effect of preultrasonic process on oil content and fatty acid composition of hazelnut, peanut and black cumin seeds. *J. Food Process. Pres.* doi:10.1111/jfpp.13335

Anonymous 1 <<http://www.lemberona.com/products/ingredients/organic-pumpkinseed-flour-defatted-austria/>>. Pristupljeno 22. kolovoza 2017.

Anonymous 2 <<https://www.malinca.hr/bio-neoljusteno-proso-500g.html>>. Pristupljeno 22. kolovoza 2017.

Anonymous 3 <[https://www.alibaba.com/product-detail/Hulled-Roasted-Buckwheat\\_50035227684.html](https://www.alibaba.com/product-detail/Hulled-Roasted-Buckwheat_50035227684.html)>. Pristupljeno 22. kolovoza 2017.

Ashokkumar, M. (2015) Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrason. Sonochem.* **25**, 17-23.

Awad, T.S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., Youssef, M. M. (2012) Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Res. Int.* **48**, 410-427.

Benítez-Páez, A., Gómez Del Pulgar, E. M., Kjølbaek, L., Kirchner Brahe, L., Astrup, A., Hingstrup Larsen, L., Sanz, Y. (2016) Impact of dietary fibre and fat on gut microbiota remodeling and metabolic health. *Trends Food Sci. Tech.* **57**, 201-212.

Białek M., Rutkowska, J., Adamska, A., Bajdalow, E. (2016) Partial replacement of wheat flour with pumpkin seed flour in muffins offered to children. *CyTA-J. Food* **14**, 391-398.

Braje, M. (2017) Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na slobodne fenolne spojeve i antioksidacijsku aktivnost bučine pogače, heljde i prosa, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

- Brenna, J. T., Salem, N. Jr., Sinclair, A. J., Cunnane, S. C. (2009)  $\alpha$ -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostag. Leukotr. Ess.* **80**, 85-91.
- Calder, P. C. (2012) Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *J. Nutr.* **142**, 592S-599S.
- Charoux, C. M. G., Shikha Ojha K., O'Donnell, C. P., Cardoni, A., Tiwari, B. K. (2017) Application of airborne ultrasonic technology in the food industry. *J. Food Eng.* **208**, 28-36.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A Review. *Ultrason. Sonochem.* **34**, 540-560.
- Chemat, F., Grondin, I., Shum Cheong Sing, A., Smadja, J. (2004) Deterioration of edible oils during food processing by ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **11**, 13-15.
- Christa, K., Soral- Šmietana, M. (2008) Buckwheat Grains and Buckwheat Products – Nutritiona and Prophylactic Value of their Components – a Review. *Czech J. Food Sci.*, **26**, 153-162.
- Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, D. (2013) Comparision of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 1076-1080.
- Dai, F.-J., Chau, C.-F. (2017) Classification and regulatory perspectives of dietary fiber. *J. Food Drug Anal.* **25**, 37-42.
- Delaš, I. (2010) Zaboravljene vrijednosti- bučino ulje. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **5**, 38-42.
- Delgado, G. E., Krämer, B. K., Lorkowski, S., März, von Schacky C., Kleber, M. E. (2017) Individual omega-9 monounsaturated fatty acids and mortality—The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *J. Clin. Lipidol.* **11**, 126-135.
- Devi, P. B., Vijayabharathi, R., Sathyabama, S., Malleshi, N. G., Priyadarisini, V. B. (2014) Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana* L.) polyphenols and dietary fiber: a review, *J. Food Sci. Technol.* **51**, 1021-1040.
- DeVries, J., W. (2003) On defining dietary fibre. *P. Nutr. Soc.* **62**, 37-43.

- Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., Patil, R. T. (2012) Dietary fibre in foods: a review. *J. Food Sci. Technol.* **49**, 255-266.
- Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22-33.
- Dunbar, B. S., Bosire, R. V., Deckelbaum, R. J. (2014) Omega 3 and omega 6 fatty acids in human and animal health: An African perspective. *Mol. Cel. Endocrinol.* **398**, 67-77.
- Dziedzic, K., Górecka, D., Kucharska, M., Przybylska, B. (2012) Influence of technological process during buckwheat groats production on dietary fibre content and sorption of bile acids. *Food Res. Int.* **47**, 279-283.
- Egan, H., Kirk, R., Sawyer, R. (1981) The Luff Schoorl method. Sugars and preserves. U: Pearson's chemical analysis of foods, 8. izdanje, Longmaan Scientific and Technical, Harlow, str. 152-153.
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., Cárcel, J. A. (2011) Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Eng. Rev.* **3**, 108-120.
- Fuller, S., Beck, E., Salman, H., Tapsell, L. (2016) New Horizons for the Study of Dietary Fiber and Health: A Review. *Plant Foods Hum. Nutr.* **71**, 1-12.
- Galán-Arriero, I., Serrano-Muñoz, D., Gómez-Soriano, J., Goicoechea, C., Taylor, J., Velasco, A., Ávila-Martin, G. (2017) The role of Omega-3 and Omega-9 fatty acids for the treatment of neuropathic pain after neurotrauma. *BBA-Biomembranes* **1859**, 1629-1635.
- Giménez-Bastida, J. A., Piskula, M. K., Zieliński, H. (2015) Recent Advances in Processing and Development of Buckwheat Derived Bakery and Non-Bakery Products- a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **65**, 9-20.
- Giménez-Bastida, J. A., Zieliński, H. (2015) Buckwheat as a Functional Food and Its Effects on Health. *J. Agr. Food Chem.* **63**, 7896-7913.
- González-Aguilar, G. A., Blancas-Benítez, F. J., Sáyago-Ayerdi (2017) Polyphenols associated with dietary fibres in plant foods: molecular interactions and bioaccessibility. *Curr. Opin. Food Sci.* **13**, 84-88.
- Gutte, K. B., Sahoo, A. K., Ranveer, R. C. (2015) Effect of ultrasonic treatment on extraction and fatty acid profile of flaxseed oil. *OCL* **22**, D606

Gyurova D., Enikova, R. (2015) Dietary fibres-definitions, classifications and analytical methods for the physiological assessment of their content in foods. *J. BioSci. Biotechnol.* [online] 209-213, <<https://www.researchgate.net>>. Pristupljeno 26. srpnja 2017.

Herceg, Z., Brnčić, M., Režek-Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* **59**, 65-69.

Heś, M., Dziedzic, K., Górecka, D., Drożdżyńska, A., Gujska E. (2014) Effect of Boiling in Water of Barley and Buckwheat Groats on the Antioxidant Properties and Dietary Fiber Composition. *Plant Foods Hum. Nutr.* **69**, 276-282.

HRN EN ISO 2171:2010, Žitarice- Određivanje ukupnog pepela spaljivanjem

HRN EN ISO 5009:2004, Životinjske i biljne masti i ulja - Priprava metilnih estera masnih kiselina

HRN EN ISO 5508:1999, Životinjske i biljne masti i ulja-Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom

HRN EN ISO 659:2010, Uljarice- Određivanje udjela ulja (Referentna metoda)

HRN ISO 1871:1999 (ISO 1871:1975 (E)) ICC 105/2, Određivanje sadržaja ukupnog dušika i izračunavanje sadržaja bjelancevina u hrani

Hromádková, Z., Ebringerová, A. (2003) Ultrasonic extraction of plant materials-investigation of hemicellulose release from buckwheat hulls. *Ultrason. Sonochem.* **10**, 127-133.

Hung, P. V., Morita, N. (2008) Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities. *Food Chem.* **109**, 325-331.

Kalinová, J. (2007) Nutritionally Important Components of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.). *Food* **1**, 91-100.

Kendall, C. W. C., Esfahani, A., Jenkins, D. J. A. (2010) The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocoll.* **24**, 42-28.

Kowalska, H., Czajkowska, K., Cichowska, J., Lenart, A. (2017) What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. *Trends Food Sci. Tech.* **67**, 150-159.

Lazos, E. S. (1992) Certain functional properties of defatted pumpkin seed flour. *Plant Food Hum. Nutr.* **42**, 257-273.

Li, C., Uppal, M. (2010) Canadian Diabetes Association National Nutrition Committee Clinical Update on Dietary Fibre in Diabetes: Food Sources to Physiological Effects. *Can. J. Diabetes* **34**, 355-361.

Luque-Garcia, J. L., Luque de Castro M. D. (2004) Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *J. Chromatogr. A* **1034**, 237-242.

Ljubičić, M., Matek Šarić, M., Rumbak, I., Colić Barić, I., Komes, D., Štalić, Z., Guiné, R. P. F. (2017) Knowledge about dietary fibre and its health benefits: a cross-sectional survey of 2,536 residents from across Croatia. *Med. Hypothesis* **105**, 25-31.

Mahalle, N., Garg, M. K., Naik, S. S., Kulkarni (2016) Association of dietary factors with severity of coronary artery disease. *Clin. Nutr. ESPEN* **15**, 75-79.

Matejčková, Z., Liptáková, D., Valík, L. (2017) Functional probiotic products based on fermented buckwheat with *Lactobacillus rhamnosus*. *LTW-Food Sci. Technol.* **81**, 35-41.

Megazyme (2017) <<https://secure.megazyme.com/Total-Dietary-Fiber-Assay-Kit>>. Pristupljeno 29. svibnja, 2017.

Megazyme, Total Dietary Fiber, Assay Procedure

Milovanović, M. M., Demin, M. A., Vucelić-Radović, V., Žarković, B. M., Stikić, R. I. (2014) Evaluation of the nutritional quality of wheat bread prepared with quinoa, buckwheat and pumpkin seed blends. *J. Agr. Sci.* **59**, 319-328.

Mudgil, D., Barak, S. (2013) Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fibre: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **61**, 1-6.

Musieak, G., Mierzwa, D., Kroehnke, J. (2016) Food drying enhancement by ultrasound-A review. *Trends Food Sci. Tech.* **56**, 126-141.

Naughton, S. S., Mathai M. L., Hryciw, D. H., McAinch, A. J. (2016) Linoleic acid and the pathogenesis of obesity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **125**, 90-99.



- Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Vicha, R., Mlcek, J. (2015) Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 12871-12890.
- Pingret, D., Durand, G., Fabiano-Tixier, A.-S., Rockenbauer, A., Ginies, C., Chemat, F. (2012) Degradation of Edible Oil during Food Processing by Ultrasound: Electron Paramagnetic Resonance, Physicochemical, and Sensory Appreciation. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 7761-7768.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., Chemat, F. (2013) Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control* **31**, 593-606.
- Pravilnik o metodama fiz.-kem. Analiza za žita i mlinske proizvode 74/88 (ICC 110/1)
- Reifen, R., Karlinsky, A., Stark, A. H., Berkovch, Z., Nyska, A. (2015) Alpha-Linolenic Acid (ALA) is an Anti-Inflammatory Agent in Inflammatory Bowel Disease. *J. Nutr. Biochem.* **26**, 1632-1640.
- Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Werner, Z. (2010) Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća. *Kem. Ind.* **59**, 169-177.
- Roche, H. M. (1999) Unsaturated fatty acids. *P. Nutr. Soc.* **58**, 397-401.
- Russo, G. L. (2009) Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 937-946.
- Saleh, A. S. M., Zhang, Q., Chen, J., Shen, Q. (2013) Millet Grains: Nutritional Quality, Processing, and Potential Health Benefits. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **12**, 281-295.
- Sanderson, E., Duizer, L. M., McSweeney M. B. (2017) Descriptive analysis of new proso millet product. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, **8**, 14-18.
- Santos Júnior, O. O., Montanher, P. H., Bonafé, E. G., do Prado, I. N., Maruyama, S. A., Matshushita, M., Visentainer, J. V. (2014) A Simple, Fast and Efficient Method for Transesterification of Fatty Acids in Foods Assisted by Ultrasound Energy. *J. Braz. Chem. Soc.* **25**, 1712-1719.
- Sarita, Ekta Singh (2016) Potential of Millets: Nutrients Composition and Health Benefits. *Journal of Scientific and Innovative Research* **5**, 46-50.

Schwingshackl, L., Hoffmann, G. (2012) Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease: Synopsis of the Evidence Available from Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients* **4**, 1989-2007.

Soria, A. C., Villamiel, M. (2010) Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends Food Sci. Tech.* **21**, 323-331.

Sun, Q., Gong, M., Ying, L., Xiong, L. (2014) Effect of dry heat treatment on the physicochemical properties and structure of proso millet flour and starch. *Carbohydr. Polym.* **110**, 128-134.

Swanson, D., Block, R., Mousa, S. A. (2012) Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Adv. Nutr.* **3**, 1-7.

Tarek-Tilistyák, J., Agócs, J., Lukács, M., Dobró-Tóth, M., Juhász-Román, M., Dinya, Z., Jekó, J., Máthe (2014) Novel breads fortified through oilseed and nut cakes. *Acta Aliment. Hung.* **43**, 444-451.

Teh, S.-S., Bekhit, A. E.-D. A (2015) Utilization of Oilseed Cakes for Human Nutrition and Health Benefits. U: Agricultural biomass based potential materials (Hakeem, K. R., Jawaid, M., Alothman, O., ured.), Springer International Publishing, Switzerland, str. 192.

Thilagavathi, T., Kanchana, S., Banumathi, P., Hemalatha, G., Vannlarajan, C. Sundar, M., Ilamaran, M. (2015) Physico-chemical and Functional Characteristics of Selected Millets and Pulses. *Indian J. Sci. Technol.* **8**, 147-155.

Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B., Lo, Y. M. (2013) Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomerganate (*Punica granatum L.*) seed oil. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 202-208.

Tolaini, V., Del Fiore, A., Nobili, C., Presenti, O., De Rossi, P., Procacci, S., Vitali, F., Brunori, A. (2016) Exploitation of Tartary buckwheat as sustainable ingredient for healthy foods production. *Agric. Agric. Sci. Proc.* **8**, 455-460.

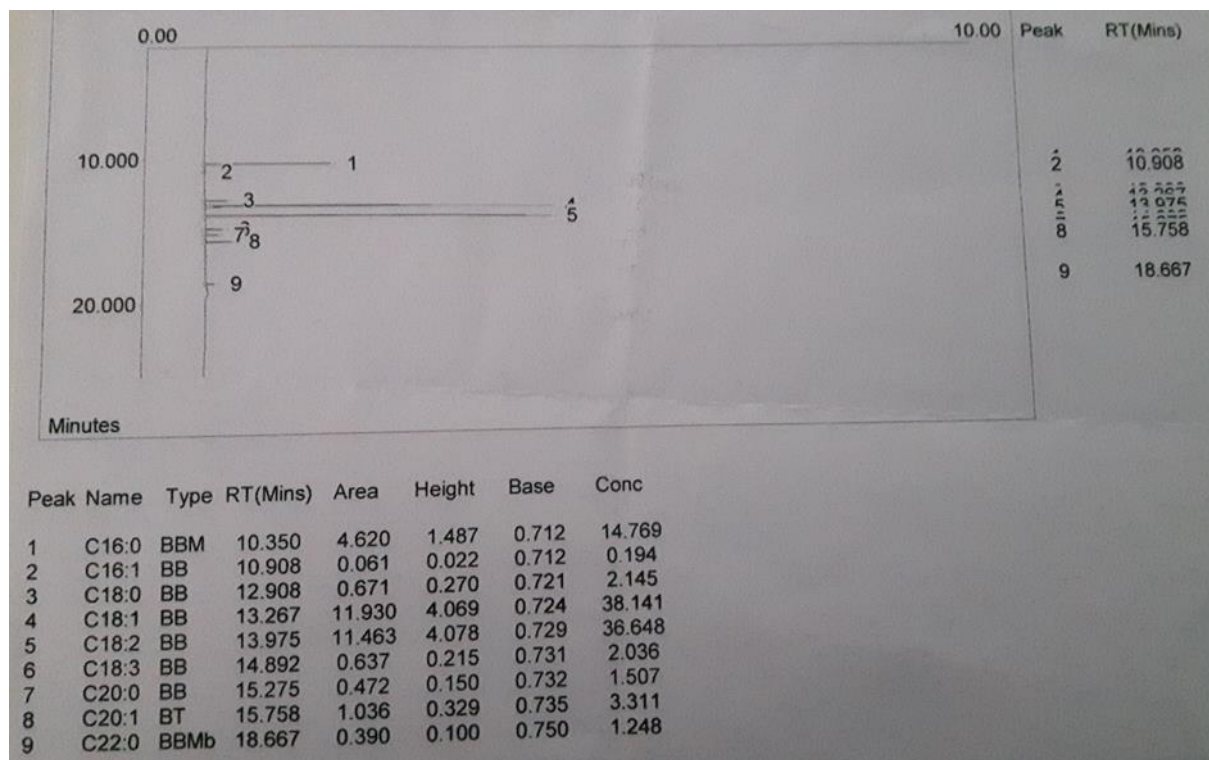
Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. (2010) Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: Influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food Bioprod. Process.* **88**, 277-282.

Vitaglione, P., Napolitano, A., Fogliano, V. (2008) Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends Food Sci. Technol.* **19**, 451-463.

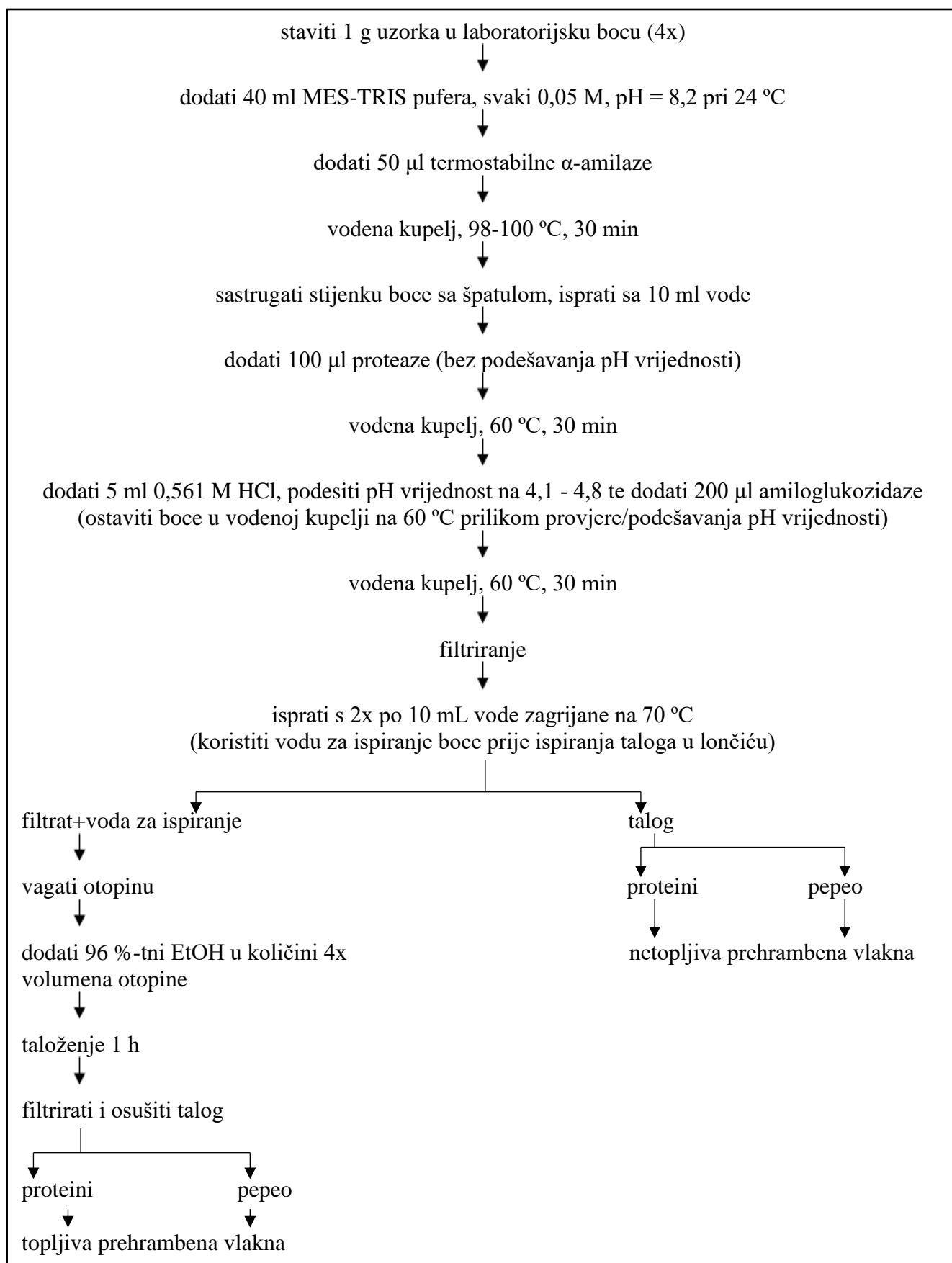
- Vranešić Bender, D. (2011) Omega-3 masne kiseline-svojstva i djelovanje. *Medix* **17**, 234-240.
- Wu, Y.-H., Qian, Y.-F., Pan, Y.-W., Li, P.-W., Yang, J., Ye, X.-H., Xu, G. (2014) Association between dietary fiber intake and risk of coronary heart disease: A meta-analysis. *Clin. Nutr.* **34**, 603-611.
- Yangilar, F. (2013) The Application of Dietary Fibre in Food Industry: Structural Features, Effects on Health and Definition, Obtaining and Analysis of Dietary Fibre: A Review. *J. Food Nut. Res.* **1**, 13-23.
- Yilmaz, T., Tavman, S. (2016) Ultrasound assisted extracion of polysaccharides from hazelnut skin. *Food Sci. Technol. Int.* **22**, 112-121.
- Zhang, L., Ye, X., Ding, T., Sun, X., Xu, Y., Liu, D. (2013) Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 222-231.
- Zhu, F. (2016) Chemical composition and health effects of Tartary buckwheat. *Food Chem.* **203**, 231-245.

## 7. PRILOZI

### 7.1. EKSPERIMENTALNI DIO



**Prilog 1.** Kromatogram masnih kiselina



**Prilog 2.** Shematski prikaz metode određivanja netopljivih i topljivih prehrambenih vlakana (Megazyme)

K-TDFR\_CALC [Način kompatibilnosti] - Excel

Datoteka Polazno Umetanje Izgled stranice Formule Podaci Pregled **Prikaz** Recite što želite učiniti

Normalno Pretpregled Izgled Prilagođeni prikazi ☒ Ravnalo ☒ Traka formule ☒ Crte rešetke ☒ Naslovi Zumiraj 100% Zumiraj odabrano Novi Razmještaj Zamrzavanje okana - Podijeli Usporedni prikaz Sinkronizirano por Otkrij Vрати izvorni položaj

D10

Mega-Calc™  
Total, Soluble & Insoluble Dietary Fibre Determination  
Setting new standards in test technology

FEED ANALYSIS  
FOOD ANALYSIS  
BEVERAGE ANALYSIS

Sample details

Instructions  
Contact Us

Sample identifier		Sample weights		Residue weights		Protein	Ash	Dietary Fibre
		m <sub>1</sub> (g)	m <sub>2</sub> (g)	R <sub>1</sub> (sample) or BR <sub>1</sub> (blank) (g)	R <sub>2</sub> (sample) or BR <sub>2</sub> (blank) (g)	P (sample) or BP (blank) (g)	A (sample) or BA (blank) (g)	% w/w
1	Sample							
	Blank							
2	Sample							
	Blank							
3	Sample							
	Blank							
4	Sample							
	Blank							
5	Sample							
	Blank							
6	Sample							
	Blank							
7	Sample							
	Blank							
8	Sample							
	Blank							
9	Sample							
	Blank							

Instructions MegaCalc

Prilog 3. Mega-Calc™ (www.megazyme.com)